

Aus dem Bereich Klinische Medizin - Transplantations- und Infektionsimmunologie

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Leitung: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester

Cytomegalievirus spezifische T-Zell-Immunität in früher Kindheit und
im Erwachsenenalter zur Identifizierung des Infektionsstatus bei
potentieller passiver humoraler Immunität

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2015

vorgelegt von Marion Ritter

geboren am 12. Oktober 1986 in Koblenz

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	8
2. Einleitung.....	12
2.1 Das humane Cytomegalievirus	12
2.2 Die Cytomegalievirus-Infektion im Setting der Transplantation.....	14
2.2.1 Das CMV-Infektionsrisiko nach Transplantation.....	14
2.2.2 Die Diagnostik der CMV-Infektion.....	15
2.2.3 Prävention und Therapie der CMV-Infektion.....	16
2.2.4 Die CMV-Infektion im Setting der pädiatrischen Transplantation.....	17
2.3 Immunologische Grundlagen	18
2.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	22
3. Material und Methodik	25
3.1 Geräte und Materialien	25
3.2 Antikörper.....	27
3.3 Antigene.....	28
3.4 Software.....	28
3.5 Probanden- und Patienten-Kollektiv	29
3.6 Quantifizierung Antigen spezifischer T-Zellen aus Vollblut.....	30
3.6.1 Antigen spezifische T-Zell-Stimulation im Vollblut	31
3.6.2 Fixierung der stimulierten Proben	31
3.6.3 Durchflusszytometrische Färbung mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern	31
3.7 Durchflusszytometrie/FACS.....	33
3.7.1 Messung und Auswertung am Durchflusszytometer.....	35
3.8 Quantitativer Anti-CMV-IgG-ELISA	37

3.8.1	Durchführung des quantitativen Anti-CMV-IgG-ELISA.....	38
3.8.2	Messung und Auswertung am multifunktionellen Plattenleser	38
3.9	CMV-DNA-Analyse	38
3.10	Statistische Analysen	39
4.	Ergebnisse	40
4.1	Nachweis CMV spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen bei CMV seropositiven Probanden ohne passive Antikörpertiter.....	40
4.2	Deutliche Übereinstimmung des T-Zell-Tests mit dem Nachweis CMV spezifischer IgG-Antikörper bei Probanden ohne passive humorale Immunität	40
4.3	Kein Nachweis CMV spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen in Nabelschnurblut reifer, gesunder Neugeborener	42
4.4	CMV spezifische CD4 ⁺ T-Zellen lassen bei seropositiven Kindern unter 18 Monaten einen tatsächlich positiven CMV-Status erkennen	43
4.5	IFN- γ ist in allen Altersgruppen das beste Readout-Zytokin bei der CMV spezifischen CD4 ⁺ T-Zell-Analyse	44
4.6	Kinder unter 18 Monaten mit CMV spezifischer CD4 ⁺ T-Zell-Immunität weisen im Vergleich zu T-Zell immunologisch negativen Kindern derselben Altersgruppe stärkere polyklonale Reaktionen der TH1- und TH17-Zellen auf	47
4.7	„Proof of principle“: Die CMV spezifische CD4 ⁺ T-Zell-Immunität erlaubt auch die Identifizierung des CMV-Status bei Erwachsenen mit passiver Immunität.....	50
5.	Diskussion.....	53
5.1	Die CMV spezifische CD4 ⁺ T-Zell-Analyse zur Demaskierung einer passiven Immunität.....	53
5.2	Die Bedeutung der exakteren Bestimmung des CMV-Infektionsstatus für die Risikoabschätzung einer CMV-Infektion nach Transplantation	55
5.3	Quantitative und qualitative Charakterisierung CMV spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen	58
5.4	Vergleich zwischen CMV spezifischer CD4 ⁺ T-Zell-Analyse und weiteren Assays zum Nachweis einer CMV-Infektion	60

5.5	Limitationen.....	61
5.6	Schlussfolgerungen und Ausblick	62
6.	Literaturverzeichnis.....	64
7.	Publikationen.....	70
7.1	Manuskripte aus dieser Arbeit	70
7.2	Manuskript mit Koautorenschaft	70
7.3	Kongressvorträge.....	71
7.4	Kongressposter	71
8.	Danksagung	73

Vorbemerkung

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden in Form von zwei Originalarbeiten publiziert (RITTER et al., 2013; SCHMIDT et al., 2012). Bei der Durchführung der Arbeit und bei der Auswertung der Daten wurde ich von Frau Dr. rer. nat. Tina Schmidt und Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester betreut.

Der Text und die Abbildungen dieser Dissertationsschrift sind daher in weiten Teilen eine deutsche Reproduktion der Originalarbeiten.

Verzeichnis der Abkürzungen

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABO	AB Null
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin (Fluorochrom)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalovirus, Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
H ₂ O dest	Aquadest, destilliertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G, Gammaglobulin
IgM	Immunglobulin M
IGRA	Interferon-Gamma Release Assays
IL	Interleukin
IQR	Interquartilbereich
K	Cohens Kappa
Ko	Kontrolle
Konz.	Konzentration
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
n	Größe der Grundgesamtheit
n.b.	nicht bekannt
NaN ₃	Natriumazid
nm	Nanometer

Abkürzung	Bedeutung
p	p-Wert, Signifikanzwert
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Inhibitory Receptor Programmed Death-1
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin Cyanin 7
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PFA	Paraformaldehyd
pp65	Phosphoprotein 65
QNAT	Quantitative Nucleic Acid Testing
RE/ml	Relative Einheit pro Milliliter
RPMI	Zellkulturmedium für normale und neoplastische Leukozyten
RT	Raumtemperatur
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SSC	Side Scatter
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
U	International Unit, Internationale Einheit
U/min	Umdrehungen/min, min^{-1} , Drehzahl

1. Zusammenfassung

Cytomegalievirus spezifische T-Zell-Immunität in früher Kindheit und im Erwachsenenalter zur Identifizierung des Infektionsstatus bei potentieller passiver humoraler Immunität

Die Diagnose des CMV-Infektionsstatus wird indirekt über den Nachweis einer CMV spezifischen serologischen Analyse getroffen. Da CMV spezifische Immunglobuline der Klasse G (IgG) transplazentar übertragen werden, kann bei Kindern im Alter bis 18 Monaten die serologische Analyse auf CMV spezifische IgG falsch positive Werte annehmen. Ähnliches gilt bei Patienten nach Gabe von Plasmapräparaten. Da CMV spezifische T-Zellen nicht transplazentar übertragen werden, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich CMV spezifische T-Zellen bei Kindern nachweisen lassen und ob diese als Alternative zur Serologie bei fraglich passiver Immunität herangezogen werden können. Darüber hinaus sollte eine umfangreiche funktionelle Charakterisierung der zellulären Immunität bei Kindern vorgenommen werden.

Hierzu wurden 59 Erwachsene (Mütter) und 168 Kinder auf CMV spezifische IgG und CMV spezifische $CD4^+$ T-Zellen untersucht. Des Weiteren wurde ein 40 Jahre alter Hämodialysepatient vor, während und nach ABO inkompatibler Nierentransplantation untersucht, der eine therapeutische Infusion von humanen Immunglobulinen erhielt. Die Identifikation der spezifischen $CD4^+$ T-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie nach CMV spezifischer und polyklonaler Stimulation durch eine Induktion von Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-17 (IL-17). Die Bestimmung der CMV-IgG erfolgte mit einem Standard ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay).

Die CMV spezifische serologische und die zelluläre Analyse zeigten bei Erwachsenen und älteren Kindern, die über 18 Monate alt waren, eine hohe Übereinstimmung. In der Gruppe der Kinder, die unter 18 Monate alt waren, wurden 17 von 30 Kindern in beiden Tests negativ getestet. Interessanterweise hatten acht von 13 seropositiven Kindern bereits nachweisbare CMV spezifische T-Zellen, während lediglich fünf von 13 Kindern T-Zell negativ waren und folglich von einer passiven Antikörper-Immunität auszugehen ist. CMV spezifische T-Zellen unterschieden sich bei jungen Kindern im Zytokinprofil von den CMV spezifischen T-Zellen älterer Probanden. Interessanterweise waren die polyklonalen Effektor T-Zell-

Frequenzen bei jungen Kindern mit nachweisbarer CMV spezifischer T-Zell-Immunität höher als bei jungen Kindern ohne CMV spezifische T-Zell-Immunität.

Bei dem exemplarisch untersuchten Hämodialysepatienten lagen sowohl die CMV spezifischen IgG-Antikörpertiter als auch die CMV spezifischen T-Zell-Frequenzen zunächst unter der Nachweisgrenze. Nach der therapeutischen Infusion von humanen Immunglobulinen hatte der Patient temporär nachweisbare CMV spezifische IgG, blieb jedoch CMV T-Zell negativ, was die passive Antikörperimmunität dokumentierte. Interessanterweise erlitt der Patient im weiteren Verlauf eine transplantatassoziierten CMV-Primärinfektion, in deren Folge sich dauerhaft CMV spezifische T-Zellen und Antikörper detektieren ließen.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass CMV spezifische T-Zellen bereits im frühen Kindesalter nachweisbar sind und bei sehr jungen Kindern das Gesamtrepertoire an Effektor-T-Zellen dominieren. Darüber hinaus wird deutlich, dass die Mehrheit der serologisch positiven Kinder unter 18 Monaten bereits eine CMV-Infektion durchlaufen hat, sodass das Ausmaß der passiven Immunität in dieser Altersklasse bislang überschätzt wurde. Die Quantifizierung CMV spezifischer T-Zellen stellt daher eine Alternative zur Serologie zur Bestimmung des CMV-Infektionsstatus bei fraglich passiver Antikörperimmunität dar, die sowohl bei Kindern unter 18 Monaten als auch bei Patienten nach Gabe von Plasmapräparaten angewandt werden kann. In der klinischen Praxis können diese Ergebnisse zu einer genaueren Risikoeinschätzung bezüglich einer CMV-Infektion im Rahmen einer Transplantation beitragen und zu einer präziseren Auswahl eines Therapiealgorithmus führen.

Summary

Cytomegalovirus-specific T cell immunity in early childhood and adulthood to identify the infection status in individuals with potential passive humoral immunity

The diagnosis of CMV infection status is made indirectly through the detection of CMV-specific serologic analysis. Because CMV-specific IgG immunoglobulins (IgG) are transmitted transplacentally, serological analysis may yield falsely positive results in children below the age of 18 months. Likewise, falsely positive titers may occur in patients after administration of plasma products. As CMV-specific T cells are not transmitted transplacentally, this thesis investigated whether CMV-specific T cells can be detected in children and whether they can be used as an alternative to serology to define the CMV infection status in cases with potential passive immunity. In addition, an extensive functional characterization of cellular immunity in children should be performed.

A total of 59 adults (mothers) and 168 children were tested for CMV-specific IgG and CMV-specific CD4⁺ T cells. Moreover, a 40 year old hemodialysis patient was analysed before and after ABO incompatible kidney transplantation, who received human immunoglobulins. The identification of specific CD4⁺ T cells was performed by flow cytometry after CMV-specific and polyclonal stimulation by the induction of interferon- γ (IFN- γ), interleukin-2 (IL-2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-4 (IL-4) and interleukin-17 (IL-17). Serological analysis of CMV IgG antibodies was carried out using a standard enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

CMV-specific serological and T cell analysis showed a high level of agreement in adults and children above the age of 18 months. Among infants below the age of 18 months, 17 out of 30 were tested negative in both assays. Interestingly, among the 13 CMV IgG seropositive children, eight already showed detectable CMV-specific T cells, while only five out of 13 had no T cells which may be considered as passive antibody immunity. The cytokine profile of CMV-specific T cells in young children differed from that observed in children and adults. Interestingly, the polyclonal effector T cell frequency in young children with detectable CMV-specific T cell immunity was higher than the polyclonal T cell frequency in young children without CMV-specific T cell immunity.

In the hemodialysis patient, both the CMV-specific IgG antibody titers and the CMV-specific T cell frequencies were below the detection limit prior to transplantation. After therapeutic

infusion of human immunoglobulins, CMV-specific IgG were temporarily detectable, whereas CMV T cells remained below detection limit, which documented passive antibody immunity. Interestingly, the patient later underwent a transplant-associated CMV primary infection, which resulted in the induction of both CMV-specific T cells and antibodies which remained permanently detectable.

In summary, this thesis shows that CMV-specific T cells are already detectable in early childhood and in very young children, and even dominate the full repertoire of effector T cells in early childhood. Moreover, it became evident that the majority of seropositive infants below 18 months has already undergone a CMV infection, which indicates that the extent of passive immunity in this age group was overestimated so far. The quantification of CMV-specific T cells therefore provides an alternative to serology for the determination of CMV infection status in individuals with potential passive immunity, which may be applicable in both children under 18 months and in patients after administration of plasma products. In clinical practice, these results may contribute to a more accurate determination of the CMV infection in the setting of transplantation and to a more precise selection of the clinical therapy algorithm.

2. Einleitung

2.1 Das humane Cytomegalievirus

Das humane Cytomegalievirus (HCMV bzw. CMV) ist ein umhülltes DNA-Virus aus der Familie der Herpesviridae (Humanes Herpesvirus 5) (GROß, 2006). Dieses Virus ist die Ursache der Cytomegalie, einer weltweit verbreiteten Erkrankung, die vorwiegend immundefiziente Patienten beeinträchtigt oder als konnatale Infektion klinische Bedeutung hat (GORTNER et al., 2012).

Abhängig vom sozioökonomischen Status sind in Deutschland 40-90% der Bevölkerung mit CMV infiziert (MODROW et al., 2010). Europäer werden bei einem niedrigen sozialen Status im frühen Lebensalter mit CMV infiziert, in dem Dreijährige zu 20-60% und 30-jährige zu über 90% CMV spezifische Antikörper aufweisen. Bei hohem Sozialstatus weisen nur 10-20% der europäischen Drei- und 40-50% der europäischen 30-jährigen CMV spezifische Antikörper auf (GROß, 2006).

Nach einmaliger Infektion persistiert CMV wie die Mitglieder der Familie der Herpesviridae lebenslang in Lymphozyten (GROß, 2006) und vermutlich auch in vielen Organen in einem latenten Zustand, aus dem es sowohl sporadisch als auch in Phasen der Immunsuppression reaktivieren kann (MODROW et al., 2010; SESTER et al., 2008a). Die Übertragung von CMV kann horizontal über Speichel, Muttermilch, Urin und andere Körperflüssigkeiten, sowie über Blutprodukte und transplantierte Organe erfolgen. Ebenso ist eine vertikale Übertragung diaplazentar und sub partu möglich. Die Inkubationszeit einer Primärinfektion durch Körpersekrete beträgt ca. 4-8 Wochen, nach Organtransplantation 4 Wochen bis 4 Monate und nach Bluttransfusion 3-12 Wochen (GORTNER et al., 2012). Die Primärinfektion mit CMV verläuft bei immunkompetenten Personen oft klinisch inapparent. Selten treten mononukleoseähnliche Symptome bei negativer EBV (Epstein-Barr-Virus)-Serologie auf (BÖCKER et al., 2008). Gelegentlich findet man Leuko- und Thrombozytopenien sowie atypische CD8⁺ T-Lymphozyten und eine erniedrigte CD4⁺ T-Lymphozytenzahl (MODROW et al., 2010).

Das Cytomegalievirus spielt eine bedeutende Rolle bei Transplantat-Empfängern und verursacht trotz Verfügbarkeit effektiver antiviraler Medikamente eine hohe Rate von Todesfällen (KOTTON et al., 2013; KOTTON et al., 2010). Nach Nierentransplantation, also

unter starker Immunsuppression, kann eine CMV-Infektion Ausdruck in einer Chorioretinitis oder einer schweren interstitiellen Pneumonie finden. Tödliche Verläufe sind darunter häufig. Seltener leiden Transplantatempfänger unter einer ulzerativen Gastroenteritis oder Enzephalitis (GROß, 2006). CMV ist ebenfalls in der Lage im Verlauf nach Transplantation eine Transplantationsvaskulitis zu verursachen, die histologisch einer Abstoßungsreaktion entspricht und zum Transplantatverlust führen kann (MODROW et al., 2010). Die Übertragung einer CMV-Infektion findet bei Transplantat-Empfängern im Wesentlichen über das Transplantat selbst statt. Klinisch betrachtet ist CMV die häufigste Ursache viraler Komplikationen bei Organempfängern und stellt damit eine Hauptquelle von Morbidität und Mortalität dar (KOTTON et al., 2013; KOTTON et al., 2010).

Unter Schwangerschaft tritt eine CMV-Primärinfektionen der Mutter in bis zu 2-6% der Fälle auf (MODROW et al., 2010). Dadurch werden ca. 30% der Feten infiziert. In der Bundesrepublik sind das ein Prozent aller Neugeborenen, wobei knapp 10% dieser Kinder bei Geburt bereits symptomatisch sind (Mikrozephalie, periventrikuläre Verkalkungen, Chorioretinitis, Hepatosplenomegalie). 10% zeigen Spätmanifestationen mit psychomotorischer Retardierung, Taubheit und neurologischen Defiziten (DIEDRICH et al., 2007). CMV ist somit der häufigste virale Erreger für Embryo- und Fetopathien. Mit der hormonellen Umstellung im Rahmen einer Schwangerschaft geht eine Aktivierung von CMV aus der Latenz einher. Die transplazentare Übertragung, die zu einer Schädigung des Feten führen kann, ist bei einer Reaktivierung jedoch selten. Die Infektion von Säuglingen und Kleinkindern nach der Geburt erfolgt durch die Muttermilch, weil nahezu alle seropositiven Mütter während der Stillphase CMV reaktivieren und in der Milch ausscheiden (MODROW et al., 2010). Der Virusnachweis kann während der Frühschwangerschaft mittels PCR aus Chorionzotten und Fruchtwasser, ab der 22. Schwangerschaftswoche aus fetalem EDTA-Blut und Amnionflüssigkeit erfolgen (DIEDRICH et al., 2007). Die konnatale Infektion durch CMV wird mittels Erregernachweis in der 1. (-3.) Lebenswoche diagnostiziert und ist erst bewiesen, wenn andere Ursachen einer konnatalen Infektion ausgeschlossen sind und der Erregernachweis mit der klinischen Symptomatik in Einklang steht. Aus Urin, Speichel, Blut und anderen Körperflüssigkeiten kann CMV isoliert und das Antigen pp65 sowie das Genom nachgewiesen werden (GORTNER et al., 2012). Eine CMV-Infektion kann ebenfalls serologisch nachgewiesen werden, wobei eine Primärinfektion durch Serokonversion (Neuerscheinen von IgG-Antikörper gegen CMV) und IgM-Antikörper nachgewiesen wird. Die

persistierende Infektion zeichnet sich durch einen dauerhaften IgG-Antikörpernachweis aus. Eine Reaktivierung geht mit einem Titeranstieg von IgG-Antikörpern und evtl. einem erneuten Nachweis von IgM-Antikörpern einher (GROß, 2006).

Die Cytomegalievirusinfektion wird bei immundefizienten Patienten (einschließlich Patienten unter Immunsuppression) mit Ganciclovir therapiert. Foscarnet kommt bei einem Nachweis von resistenten Stämmen zum Einsatz (GORTNER et al., 2012). Bei hämatogener Streuung des Virus bei Transplantierten, bei akuten Infektionen in der Frühschwangerschaft, sowie bei Verdacht auf perinatale Infektionen erfolgt eine Verabreichung von Hyperimmunglobulinpräparaten (MODROW et al., 2010). Bei Säuglingen mit einer symptomatischen konnatalen CMV-Infektion ist ebenfalls ein Therapieversuch mit Ganciclovir sinnvoll. Ob eine asymptomatische konnatale Infektion therapiert werden sollte, ist noch unklar (GORTNER et al., 2012), da alle antiviralen Substanzen schwerwiegende unerwünschte Arzneimittelwirkungen verursachen können. Ein Impfstoff steht bisher nicht zur Verfügung (KOTTON et al., 2013; MODROW et al., 2010).

2.2 Die Cytomegalievirus-Infektion im Setting der Transplantation

2.2.1 Das CMV-Infektionsrisiko nach Transplantation

Das Risiko einer CMV-Primärinfektion oder -Reaktivierung nach Transplantation wird wesentlich durch den CMV-Status von Transplantat-Empfänger und -Spender bestimmt. Unter den Bedingungen einer Immunsuppression durch Transplantation ist das Risiko für CMV abhängige Komplikationen am geringsten bei CMV negativen Transplantatempfängern eines CMV negativen Organs. Ein moderates Risiko besteht, wenn der Transplantatempfänger CMV positiv ist, vernachlässigbar ist dann ob er ein Transplantat eines CMV positiven oder negativen Spenders erhält. Am höchsten ist das Risiko wenn ein CMV negativer Patient ein Organ eines CMV positiven Spenders erhält (KOTTON et al., 2010). Die korrekte Bestimmung des CMV-Infektionsstatus von Spender und Empfänger sowie die Einordnung in eine der Risikogruppen ist essentiell bei der Auswahl der therapeutischen Strategie, sodass der Organempfänger je nach Spender-Empfänger-Konstellation eine prophylaktische, eine präemptive oder eben keine Therapie erhalten kann.

2.2.2 Die Diagnostik der CMV-Infektion

Das klinisch etablierte Routineverfahren zur Bestimmung des CMV-Status ist die serologische Analyse CMV spezifischer Antikörper bei Spender und Empfänger (FISHMAN, RUBIN, 1998). Diese Analyse sollte möglichst durch Bestimmung CMV spezifischer IgG-Antikörpertiter vorgenommen werden, da dieser Parameter im Ergebnis spezifischer ist als eine Bestimmung von IgM-Antikörpern (LAZZAROTTO et al., 1997; SEED et al., 2009). Weil der CMV-Status von Spender und Empfänger einen direkten Einfluss auf das Infektionsrisiko sowie auf die individuell daraus abgeleitete Präventionsstrategie nach einer Transplantation hat, sollte der Test eine hohe Sensitivität sowie Spezifität aufweisen. Die serologischen Tests, die zurzeit zur Anwendung kommen, unterscheiden sich diesbezüglich voneinander und sind bislang nicht standardisiert (KOTTON et al., 2013). Im Setting der Transplantationsvorbereitung wird der Serostatus bereits auf der Warteliste bestimmt und sollte bei CMV seronegativen Empfängern erneut durchgeführt werden, wenn viel Zeit zwischen dem Prätransplantationsscreening und dem Transplantationszeitpunkt verstrichen ist. Grundsätzlich ist die Aussagekraft der Serologie eingeschränkt, wenn Spender oder Empfänger kurz zuvor Bluttransfusionen erhalten haben. Im Rahmen einer Bluttransfusion können Antikörper passiv übertragen werden, was falsch positive Werte in der serologischen Testung zur Folge haben kann (PREIKSAITIS et al., 2002). Konkret könnte ein falsch positiver Serostatus bei CMV negativen Organspendern nach Polytrauma oder bei Transplantatempfängern nach akutem Leberversagen auftreten, die Plasmapräparate erhalten haben (SESTER et al., 2003). Der Effekt von Bluttransfusionen auf die CMV-Serologie von Organspendern wurde durch Screening mittels CMV-IgG-ELISA nachgewiesen und zeigte in 40% der Fälle falsch positive Werte, die durch passive Antikörper hervorgerufen wurden. Demgegenüber konnte nachgewiesen werden, dass ein verdünnender Effekt von Bluttransfusionen zur Folge haben kann, dass Antikörpertiter unter die Nachweisgrenze sinken, sodass bei Patienten mit eigentlich positivem CMV-Infektstatus ein falsch negativer CMV-Serostatus gemessen wird (PREIKSAITIS et al., 2002). Ähnlich verhält es sich bei therapeutischen Anwendungen von Immunglobulinen, sodass es sinnvoll erscheint, die vor Transfusion bestimmten serologischen Ergebnisse bei der Beurteilung des Serostatus mit zu berücksichtigen und den serologischen Status vor und nach Transfusion gegenüberzustellen (KOTTON et al., 2010). Generell können Antikörpertiter in der Nähe der Nachweisgrenze eine präzise Diagnostik des CMV-Status mittels Serologie erschweren (SESTER et al., 2003). Eine

frühere Untersuchung unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass auf der Basis einer einmaligen Screening-Untersuchung mittels Serologie 2,1% der Patienten aufgrund grenzwertiger Antikörpertiter als falsch negativ bezüglich eines CMV-Infekts eingeordnet wurden (SESTER et al., 2003). Diese Fehleinschätzung kann in der klinischen Praxis unmittelbar in einem Anstieg des Infektionsrisikos für Transplantatempfänger resultieren.

Betrachtet man die Situation nach Transplantation, bei der die Diagnose einer aktiven CMV-Infektion im Vordergrund steht, verliert die Serologie ihren Stellenwert (KOTTON et al., 2010). Ungeeignet für die Routinediagnostik der CMV-Infektion sind des Weiteren auch die Blutkultur (KOTTON et al., 2010), die Urinkultur (PILLAY et al., 1993), die kulturelle Anzüchtung aus einer bronchioloalveolären Lavage (BUFFONE et al., 1993; STORCH et al., 1993), sowie der pp67-Test (Phosphoprotein 67-Test) (CALIENDO et al., 2002; GERNA et al., 2003), denn diese Verfahren liefern keine hinreichend aussagekräftigen Ergebnisse, um im Posttransplantationsmanagement eine klinische Entscheidung ausreichend stützen zu können (KOTTON et al., 2010). Allein der pp65-Nachweis, und die quantitative Messung der Virus-DNA (quantitative nucleic acid testing, QNAT) sind im klinischen Posttransplantationsmanagement nützlich. Diese beiden Tests sind weitgehend verfügbar und zeigen eine gute, wenn auch nicht absolute Korrelation (CALIENDO et al., 2002; CALIENDO et al., 2000; PIIPARINEN et al., 2004).

2.2.3 Prävention und Therapie der CMV-Infektion

Zur Prävention der CMV-Infektion nach Transplantation werden derzeit zwei Strategien eingesetzt, eine universelle Prophylaxe oder eine präemptive Therapie (KOTTON et al., 2013; KOTTON et al., 2010). Die universelle Prophylaxe sieht eine Verabreichung antiviraler Medikamente vor, obwohl keine Hinweise für eine Virusreplikation bestehen (KOTTON et al., 2013). Die Prophylaxe soll bereits in der frühen Posttransplantationsphase begonnen werden und für einen Zeitraum von 3-6 Monaten weitergeführt werden (KOTTON et al., 2013). Die präemptive Therapie hingegen zeichnet sich dadurch aus, dass eine virale Replikation durch Monitoring in regelmäßigen Intervallen schon früh in asymptomatischem Status erkannt wird. Mit diesem Wissen erhalten nur die Patienten gezielt eine Pharmakotherapie, die Hinweise auf aktive Virusvermehrung zeigen, wodurch nicht mehr alle Patienten unerwünschten Arzneimittelwirkungen ausgesetzt werden müssen und Kosten für Arzneimittel eingespart werden können. Im Vergleich zur Prophylaxe ist die präemptive

Therapie hingegen aufwendiger in der Diagnostik, da Reaktivierungsereignisse nur durch regelmäßige Viruslastmessungen frühzeitig erkannt werden können (KOTTON et al., 2013; KOTTON et al., 2010).

Sowohl die Prophylaxe als auch das präemptive Therapieschema sind bisher gute Mittel, um eine CMV-Erkrankung zu verhindern. Bei CMV negativen Empfängern eines CMV positiven Organs wird bevorzugt die prophylaktische Therapie empfohlen, mit der eine Primärinfektion im Idealfall verhindert werden kann. Die prophylaktische antivirale Therapie ist bei dieser Konstellation mit einem besseren Transplantatüberleben und klinischen Outcome verbunden (KOTTON et al., 2010). Die präemptive Therapie wird ausschließlich nur dann empfohlen, wenn der Transplantatempfänger einem wöchentlichen Viruslast-Monitoring unterzogen werden kann. Lediglich dann scheint ein präemptives Therapieregime, in dem Patienten mit Reaktivierungsereignissen medikamentös behandelt werden, erfolgreich zu sein (KOTTON et al., 2013; KOTTON et al., 2010).

2.2.4 Die CMV-Infektion im Setting der pädiatrischen Transplantation

Bei kindlichen Organtransplantatempfängern stellt die CMV-Infektion ebenfalls einen Hauptgrund für Morbidität und Mortalität dar (KOTTON et al., 2013; KOTTON et al., 2010). Kinder sind genauso wie Erwachsene gefährdet, nach Transplantation eine primäre CMV-Infektion zu entwickeln, in jungen Jahren ist jedoch die Wahrscheinlichkeit dafür viel größer, da meist noch kein Kontakt zu diesem Virus bestand (KOTTON et al., 2013; KOTTON et al., 2010). Innerhalb von zwei Jahren nach Transplantation erlitten 10-20% der lebertransplantierten Kinder in insgesamt fünf Zentren in den USA eine CMV-Erkrankung (GREEN et al., 2006). Das Risiko für eine CMV-Infektion bei CMV negativem Empfänger eines ebenso negativen Organs besteht durch Umweltkontakte in der gesamten Posttransplantationsphase (KOTTON et al., 2010). Der Nachweis der CMV-Infektion erfolgt bei Kindern ähnlich wie bei Erwachsenen. Es ergeben sich lediglich Einschränkungen aufgrund von kleineren Blutmengen, die bei jungen Patienten für diagnostische Zwecke zur Verfügung stehen (KOTTON et al., 2010).

Bei der Interpretation der Ergebnisse der serologischen Testverfahren zur Bestimmung des CMV-Statuts muss zusätzlich beachtet werden, dass Kinder unter 18 Monaten möglicherweise passive mütterliche Antikörpertiter tragen, die sie diaplazentar erworben haben und ihnen in den ersten Monaten nach Geburt als Nestschutz dienen (KOTTON et al.,

2010). Folglich kann eine Serologie in diesem Alter aufgrund von passiven mütterlichen Antikörpertitern falsch positiv sein (KOTTON et al., 2010). Die internationalen Konsensus Guidelines empfehlen daher bei kindlichen Transplantatempfängern grundsätzlich von der höchsten Risikokonstellation auszugehen und eine entsprechende Prävention durchzuführen. Dementsprechend sollten Spender in einem Alter unter 18 Monaten konsequent als CMV positiv eingestuft werden. Kindliche Organempfänger unter 18 Monaten sollten jedoch stets CMV negativ eingestuft werden, auch wenn serologisch CMV spezifische Antikörper nachweisbar sind (KOTTON et al., 2010).

Die Wahl der Behandlungsstrategie (Prophylaxe versus präemptive Therapie) ist bei Kindern dadurch erschwert, dass die Datenlage bei pädiatrischen Transplantationen begrenzt ist. Schwierigkeiten bereiten auch unerwünschte Arzneimittelwirkungen sowie Resistenzentwicklungen des Cytomegalievirus. Einzelne Fallberichte deuten bereits auf eine rapide Zunahme von Ganciclovir-Resistenzen hin. Bezüglich der beschriebenen Resistenzlage in diesem jungen Alter fehlen jedoch Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven, sodass bisher nicht feststeht wie ausgeprägt die Resistenzlage gegen Ganciclovir tatsächlich ist. Die zurzeit verfügbaren Alternativen sind ähnlich wie im Erwachsenenbereich Foscarnet und Cidofovir. Aufgrund nephrotoxischer unerwünschter Arzneimittelwirkungen ist die Anwendung dieser Medikamente jedoch limitiert. Darüber hinaus gibt es zusätzliche therapeutische Optionen, zu denen keine Daten im pädiatrischen Bereich vorliegen. Dazu gehören der Einsatz von Maribavir, Leflunomid und Artesunate (KOTTON et al., 2010).

2.3 Immunologische Grundlagen

Primäre lymphatische Organe wie Thymus oder Knochenmark sind Orte der antigenunabhängigen T- bzw. B-Lymphozyten-Reifung. Die antigenspezifische Aktivierung findet erst in sekundären lymphatischen Organen, wie Lymphknoten, Milz und in Mukosa assoziierten Lymphgeweben statt (GROß, 2006).

Die Erkennungsstruktur der T-Zellen für Pathogene ist der T-Zell-Rezeptor (TCR), der Fremdantigene in Form von Peptiden im Kontext mit MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche von Antigen präsentierenden Zellen erkennt. Dieser T-Zell-Rezeptor ist aus einem heterodimeren Membranprotein aufgebaut und tritt in zwei Formen auf, der $\alpha\beta$ - oder der $\gamma\delta$ -Form, wobei allein die $\alpha\beta$ -Form eine Bedeutung für die spezifische Immunität hat (GROß, 2006). Mit diesem TCR ist ein Heterotrimer (CD3) verbunden. Dieser sendet ein Signal in das

Zellinnere, wenn der T-Zell-Rezeptor Fremd-Peptide im Kontext mit MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche erkennt. B-Zell-Rezeptoren bestehen aus monomeren, membranständigen IgM-Molekülen und sind in der Lage freie Antigene zu erkennen (GROß, 2006).

Professionell antigenpräsentierende Zellen (APC) exprimieren MHC-Klasse-II-Moleküle, welche der Präsentation extrazellulärer Antigene dienen, die über Phagozytose oder Rezeptor vermittelte Endozytose aufgenommen wurden. Im Phagosom werden diese Antigene nach einem Zusammenschluss mit Lysosomen in Peptidfragmente gespalten. Die Fusion führt zu einem Phagolysosom, welches anschließend mit einem Endosom verschmilzt. Endosomen sind MHC-II-haltig. Das MHC-II-Molekül wird mit Peptidfragmenten einer Länge von 10-12 Aminosäuren beladen und zur Zelloberfläche transportiert, wo es mit dem kostimulatorischen Protein B7 durch $CD4^+$ T-Zellen erkannt wird. Auch B-Zellen können Antigene über den membranständigen B-Zell-Rezeptor aufnehmen und nach Prozessierung in MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentieren (GROß, 2006).

Kernhaltige Körperzellen bis auf intakte Neurone exprimieren MHC-Klasse-I-Moleküle (GROß, 2006). Die Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen mit Fremdpeptidfragmenten erfolgt im endoplasmatischen Retikulum. Eine wesentliche Voraussetzung dafür ist die aktive Neusynthese der viralen Proteine, die nur in infizierten Zellen stattfindet, in denen virale Gene im Rahmen der Virusreplikation exprimiert und in Proteine translatiert werden. Die Antigene werden durch das Proteasom zu ca. 9 Aminosäure langen Peptiden gespalten. Diese werden dann in das endoplasmatische Retikulum transportiert und an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden. Der gebildete Komplex gelangt über Golgi-Vesikel und das Trans-Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche und wird in der Membran verankert, wo er von $CD8^+$ T-Zellen erkannt wird (GROß, 2006; MODROW et al., 2010). Auch bei der Aktivierung der $CD8^+$ T-Zellen ist ein kostimulatorisches Signal von Seiten der antigenpräsentierenden Zelle neben der Wechselwirkung zwischen T-Zell-Rezeptor mit MHC-Peptid-Komplex von zentraler Bedeutung. Diese Kostimulation wird vermittelt durch die Interaktion von B7-Proteinen oder CD40-Proteinen auf APCs mit den entsprechenden Liganden auf den T-Zellen (CD28-Protein bzw. CD40-Ligand). Nur wenn sowohl Antigen spezifische als auch kostimulatorische Signale vorliegen, kommt es zu einer T-Zell-Aktivierung, die vermittelt über die Ausschüttung von Zytokinen wie z.B. IL-2 eine Proliferation und somit eine klonale Expansion Antigen

spezifischer T-Lymphozyten auslöst. Fehlt das kostimulatorische Signal, werden die T-Zellen funktionell anergisiert (MODROW et al., 2010).

Werden Peptidfragmente im Rahmen der spezifischen Immunantwort auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert entwickeln sich $CD4^+$ T-Zellen zu antigenspezifischen T-Helferzellen (TH0). Unter Anwesenheit zahlreicher Zytokine wie IL-2, IL-4, oder IFN- γ (GROß, 2006), die durch naive T-Helferzellen bei ihrem primären Antigenkontakt gebildet werden (MODROW et al., 2010), kommt es zur weiteren Differenzierung dieser Zellen (GROß, 2006). Eine Untergruppe der T-Effektor-Zellen, die als Reaktion auf eine Infektion gebildet werden, sind die TH17-Zellen. TH17-Zellen verlassen die Lymphknoten und migrieren zu den peripheren Infektionsherden, wo sie Antigen spezifisch stimuliert werden. Dies geht mit einer Sekretion von Zytokinen der IL-17-Familie einher. IL-17 wirkt an Infektionsherden, indem es lokal Zellen dazu veranlasst Zytokine und Chemokine freizusetzen, die wiederum neutrophile Zellen anlocken. TH17-Zellen produzieren ebenfalls IL-22, welches mit IL-17 kooperativ wirkt und mit diesem zusammen die Expression von antimikrobiellen Peptiden induziert. So wirken pathogenspezifische TH17-Zellen als effiziente Verstärker des angeborenen Immunsystems in einer frühen Phase an Infektionsherden (BEDOYA et al., 2013; MURPHY et al., 2009; ZUNIGA et al., 2013).

Stark wirksame TH1- oder TH2-Reaktionen entstehen bei einer länger andauernden Infektion, wenn die spezialisierte Aktivität dieser T-Zell-Untergruppen erforderlich ist, um Krankheitserreger vollständig zu beseitigen. Durch das Voranschreiten der Immunantwort werden Zytokine gebildet, die naive T-Zellen auf die TH1- oder die TH2-Untergruppen festlegen (MURPHY et al., 2009). Sind IL-12 und IFN- γ vorhanden (MURPHY et al., 2009), kommt es zur Entwicklung von TH1-Zellen, TH2-Zellen bilden sich, wenn IL-4 und IL-6 vorhanden sind. Zytokine aktivieren letztlich die Transkriptionsfaktoren, die zu einer TH1- oder TH2-Entwicklung führen. IFN- γ hemmt dabei die Proliferation von TH2-Zellen (MURPHY et al., 2009). TH2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6 und auch IL-10. Diese Zytokine können B-Zellen aktivieren und damit eine humorale Immunantwort durch antikörperproduzierende Plasmazellen auslösen (GROß, 2006). TH1-Zellen bilden IFN- γ , IL-2 und TNF- β und fördern damit die Aktivierung weiterer T-Helferzellen, sowie die Aktivierung einer zellulären Immunität in Form von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen, die sich gegen intrazelluläre Erreger wie Viren richten können (MODROW et al., 2010). TH2-Zellen hemmen

darüber hinaus durch IL-10-Bildung eine TH1-Antwort an, während sie die eigene TH2-Antwort fördern (GROß, 2006).

Für eine endgültige B-Zell-Aktivierung werden noch weitere als die bisher beschriebenen Faktoren benötigt. Mittels ihres B-Zell-Rezeptors muss die B-Zelle das Antigen binden und aufnehmen, damit es durch MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentiert werden kann. Eine passende TH2-Zelle erkennt dann mit ihrem T-Zell-Rezeptor dieses Peptidfragment, wobei es gleichzeitig zu einer Wechselwirkung zwischen dem CD40-Ligand der TH2-Zelle und dem Glykopeptid CD40 der B-Zelle kommt. Letztlich führt die TH2-Zell vermittelte Aktivierung zur Differenzierung von der B-Zelle in eine Plasmazelle, die Antikörper in löslicher Form sezerniert. Wenn der Organismus zum ersten Mal durch einen Erreger infiziert wird, wird zunächst IgM gebildet, im Verlauf der Infektion kommt es zu einem Immunglobulin-Klassenwechsel, der durch einen Übergang in eine IgG-Produktion gekennzeichnet ist. Nach Kontrolle der Infektion verbleiben einige B-Zellen in Form von Gedächtniszellen dauerhaft im Organismus. Diese immunologische Speicherung von Information ermöglicht bei einem sekundären Erregerkontakt eine sehr viel schnellere Reaktion als bei Erstkontakt. Hier reicht allein schon die Bindung des B-Zell-Rezeptors an ein MHC-II gebundenes Antigen, um eine Aktivierung der Gedächtniszelle auszulösen und eine Antikörperproduktion erneut in Gang zu setzen (GROß, 2006).

Innerhalb von T-Zellen kommt es zur Differenzierung von zwei Typen von Gedächtniszellen, die unterschiedliche Aktivierungsmerkmale aufweisen. Effektorgedächtnis-Zellen können sehr schnell zu T-Effektor-Zellen heranreifen und nach einer erneuten Stimulation große Mengen IFN- γ , IL-4 und IL-5 sezernieren. Demgegenüber brauchen zentrale Gedächtniszellen länger um sich zu T-Effektor-Zellen zu differenzieren (MURPHY et al., 2009).

Die Expansion von T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen mit hochaffinen T-Zell-Rezeptoren sowie die Differenzierung von Antikörper produzierenden Plasmazellen erfolgt in sekundären Lymphorganen nach Kontakt mit einem Erreger. Mit Ausnahme der transplazentar übertragenen Viren findet dieser Kontakt erst nach der Geburt statt. Wird ein Embryo in Utero infiziert, kann er ab der 22. Schwangerschaftswoche selbst IgM- und auch IgG-Antikörper bilden und es gibt Hinweise, dass eine CMV Infektion in Utero auch bereits eine Differenzierung von CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen induzieren kann (HUYGENS et al., 2014). Ansonsten wird dem Neugeborenen während der Schwangerschaft ein primärer spezifischer

Schutz durch mütterliche Antikörper, eine sogenannte Leihimmunität, übertragen. Eine Voraussetzung für den Antikörpertransfer ist die großflächige Auflösung der maternalen Plazentaanteile. Dadurch kann das maternale Blut direkt die von der Chorionmembran umgebenen fetalen Kapillaren, die für Antikörper der Subklasse IgG durchlässig sind, umspülen (MODROW et al., 2010). Diese maternalen passiven Antikörper werden nach und nach abgebaut, man geht jedoch davon aus, dass die mütterlichen Antikörper bis zu 18 Monate postpartal im kindlichen Organismus persistieren können (KOTTON et al., 2010).

2.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Der CMV-Infektionsstatus wird durch die CMV-Serologie ermittelt, die in aller Regel zuverlässige Testergebnisse liefert. Unsicherheit bei der Serologie besteht allerdings bei Antikörpertitern in der Nähe des diagnostischen Grenzwertes oder bei Transplantat-Spendern oder -Empfängern, bei denen eine passive Antikörperimmunität nicht auszuschließen ist. Hierzu zählen Kinder unter 18 Monaten aufgrund mütterlicher Antikörpertiter (Nestschutz) sowie Erwachsene nach Gabe von Antikörperpräparaten (Abbildung 1). In dieser Situation ist die Einordnung in eine der oben genannten Risikogruppen erschwert, sodass in der klinischen Praxis immer das höchste Risiko angenommen werden sollte (KOTTON et al., 2010). Bislang wurde noch nicht untersucht, inwieweit die Analyse CMV spezifischer T-Zellen bei Patienten mit passiver Immunität zu einer exakteren Bestimmung des CMV-Status beitragen könnte. Dies wurde in den CMV-Konsensus-Guidelines als ein wichtiges Forschungsziel definiert (KOTTON et al., 2010), das im Rahmen dieser Arbeit aufgegriffen wurde. Diese Intention erscheint vielversprechend, da T-Zellen weder plazentar noch bei therapeutischer Gabe von Antikörperpräparaten übertragen werden.

Weil darüber hinaus bislang unzureichend untersucht ist, inwieweit die bei Erwachsenen etablierten Verfahren zum Nachweis einer zellulären Immunität auch bei Kindern zuverlässig funktionieren und eingesetzt werden können, sollte im Rahmen dieser Arbeit auch eine umfangreiche Charakterisierung der CMV spezifischen und polyklonalen Immunfunktion bei Kindern im Altersverlauf im Vergleich mit Erwachsenen durchgeführt werden. Bei allen Probanden wurde zudem die CMV-Serologie ermittelt, um die Aussagekraft der zellulären und humoralen Immunität zur Bestimmung des CMV-Status direkt zu vergleichen.

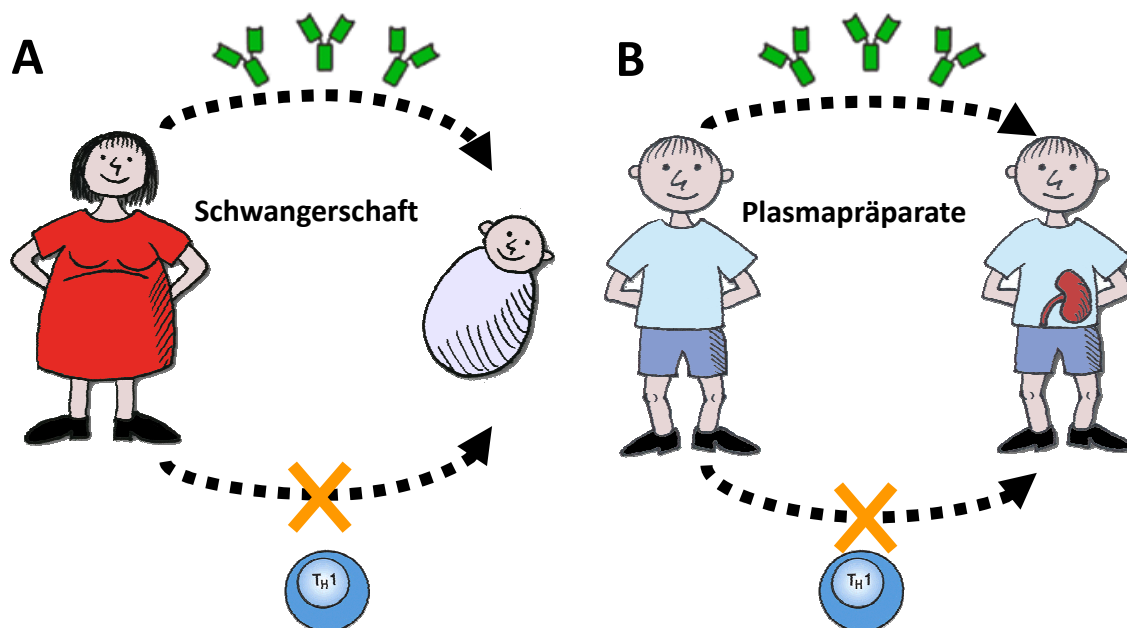


Abbildung 1. Grafische Darstellung der Übertragbarkeit von Antikörpern und TH1-Zellen während der Schwangerschaft und durch Plasmapräparatgabe. Übertragung von mütterlichen Antikörpern auf das Kind während der Schwangerschaft (A) und durch Plasmapräparate (B). Ein Transfer von TH1-Zellen findet weder unter Schwangerschaft noch über Plasmapräparate statt. Zeichnung von Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester.

Schließlich sollte die Bedeutsamkeit der CMV spezifischen T-Zell-Analyse im Vergleich zur Serologie zur Identifikation des CMV-Infektionsstatus auch bei Erwachsenen mit passiver Immunität evaluiert werden. Dies erfolgte am Beispiel eines CMV seronegativen Hämodialysepatienten, der aufgrund einer ABO inkompatiblen Nierentransplantation eine therapeutische Infusion humaner Immunglobuline erhielt.

Folgende Fragen wurden im Einzelnen behandelt

- Sind CMV spezifische CD4⁺ T-Zellen bei CMV seropositiven Probanden im Kindesalter nachweisbar und ist die CMV spezifische CD4⁺ T-Zell-Analyse mit der CMV spezifischen IgG-Analyse bei Probanden ohne passive Immunität vergleichbar?
- Sind CMV spezifische CD4⁺ T-Zellen bereits im Nabelschnurblut nachweisbar und wird ein mütterlicher CMV-IgG-Antikörpertiter in allen Fällen auf das Kind übertragen?
- Können CMV spezifische CD4⁺ T-Zellen bei seropositiven Kindern unter 18 Monaten einen positiven CMV-Status anzeigen?
- Welches Zytokin ist das beste Readout-Zytokin zum Nachweis CMV spezifischer CD4⁺ T-Zellen bei Kindern?

- Existiert ein Unterschied in der polyklonalen Immunfunktion der TH1-, TH2- und TH17-Zellen bei Kindern im Altersverlauf?
- Ist die CMV spezifische CD4⁺ T-Zell-Analyse unter den Bedingungen einer passiven Antikörpergabe der serologischen Nachweismethode überlegen?

3. Material und Methodik

3.1 Geräte und Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Materialien sind in Tabelle 2-4 gelistet.

Tabelle 2: Geräte

Geräte	Firma, Firmensitz
Brutschrank (Hera cell 150)	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer (FACSCanto II)	BD Biosciences, Heidelberg
Kolbenhubpipetten (10, 20, 100, 200, 1000µl)	Abimed, Langenfeld
Multifunktionaler Plattenleser (Victor X4)	PerkinElmer, Rodgau
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	Integra Biosciences, Fernwald
Präzisions Dispenser Tips (5ml)	Eppendorf, Hamburg
Reagiergefäße (1,5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen für die Durchflusszytometrie (5ml FACS Röhrchen)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen Polypropylen (15ml Falcon)	Greiner, Frickenhausen
Serologische Pipette (2, 5, 10, 25ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Werkbank (Hera Safe)	Heraeus, Hanau
Vortex Mixer 7-2020	neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Zentrifuge Laborfuge	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

Tabelle 3: Chemikalien und Kits

Chemikalien und Kits	Firma, Firmensitz
Anti-CMV-ELISA-Kit (IgG)	Euroimmun, Lübeck
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Brefeldin A	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva, Heidelberg
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma, Steinheim
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
Lysing-Lösung (10x konzentriert, 1x Verdünnung mit H ₂ O dest.)	BD Biosciences, Heidelberg
Natriumazid (NaN ₃)	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd	AppliChem, Darmstadt
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	PAA, Cölbe
Penicillin-Streptomycin	PAA, Cölbe
RPMI-Medium 1640 + 1% L-Glutamin	Sigma, Steinheim
Saponin	Sigma, Steinheim

Tabelle 4: Puffer und Medien

Puffer und Medien	Zusammensetzung
Brefeldin A-Stocklösung	5mg/ml in Ethanol
FACS-Puffer	PBS, 5% FCS, 0,5% BSA, 0,07% NaN ₃
Natriumazid (NaN ₃)-Lösung	10% in H ₂ O dest.

Puffer und Medien	Zusammensetzung
Paraformaldehyd-Stocklösung	5g in 200ml PBS, pH 7,4-7,6
Saponin-Stocklösung	2g Saponin in 39,7ml sterilem PBS + 0,28ml 10%iges NaN ₃
Saponin-Puffer	FACS-Puffer, 0,1% Saponin
Zellkulturmedium	RPMI, 1% Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin, 5% FCS

3.2 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 gelistet.

Tabelle 5: Kostimulatorische Antikörper

Antikörper	Klon	Ig Klasse	Konzentration	Firma, Firmensitz
anti-CD28	L293	IgG1 k	0,5mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD49d	9F10	IgG1 k	1mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 6: Zur durchflusszytometrischen Analyse verwendete Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Ig Klasse	Konzentration
anti-CD4	PE-Cy7	SK3	IgG1 k	0,012mg/ml
anti-CD69	PerCP	L78	IgG1	0,05mg/ml
anti-IFN- γ	FITC	4S.B3	IgG1 k	0,5mg/ml
anti-TNF- α	APC	MAb 11	IgG1	0,2mg/ml
anti-IL-2	PE	MQ1-17H12	IgG2a	n. b.*
anti-IL-4	PE	8D4-8	IgG1	0,2mg/ml
anti-IL-17	AlexaFluor647	SCPL1362	IgG1 k	n. b.*

*n. b.: Konzentrationsangaben des Herstellers sind nicht bekannt; alle Antikörper wurden von der Firma BD Biosciences bezogen.

3.3 Antigene

Die Antigene zur spezifischen Stimulation sind in Tabelle 7 gelistet.

Tabelle 7: Antigene

Antigene	Firma, Firmensitz
CMV-Ag: Stockkonz. n. b. (in H ₂ O angelöst und gelagert bei -70°C); Endkonz. 32 µl/ml	Virion/Serion, Würzburg
Ko-Ag: Stockkonz. n. b. (in H ₂ O angelöst und gelagert bei -70°C); Endkonz. 32 µl/ml	Virion/Serion, Würzburg
SEB: <i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B (Stock 1mg/ml in H ₂ O, Endkonz. 2,5µg/ml)	Sigma, Steinheim

3.4 Software

Die verwendete Software ist in Tabelle 8 gelistet.

Tabelle 8: Software

Software	Verwendungszweck
BD FACSDiva Software 6.1.3	Messung und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten
EndNote X5/ X7	Literaturverwaltung
Graph Pad Prism 5.03	statistische Auswertung, graphische Darstellung
Microsoft Office Access 2003	Datenverwaltung
Microsoft Office Excel 2003/2007/2010	statistische Auswertung
Microsoft Office Word 2003/2007/2010	Textverarbeitung
PowerPoint 2003/2007/2010	graphische Darstellung/Präsentation
WorkOut Software 2.5	Messung und Auswertung der ELISA-Daten

3.5 Probanden- und Patienten-Kollektiv

Die demografischen Daten der Probanden und Patienten zeigt Tabelle 9.

Tabelle 9: Demografische Daten der Probanden und Patienten

Probanden/Patienten	n (%)	Alter (Jahre)	weibliches Geschlecht (%)
Kinder < 18 Jahre	168 (100)	7,02 ± 6,37	56,0
Kinder > 18 Monate	109 (64,9)	10,68 ± 4,90	57,8
Kinder < 18 Monate (kein Nabelschnurblut)	30 (17,9)	0,48 ± 0,51	53,3
Nabelschnurblut (Neugeborene)	29 (17,3)	0	51,7
Mütter	59 (100,0)	29,67 ± 5,78	100,0
Hämodialysepatient vor und nach AB0 inkompatibler Nierentransplantation	1	40	männlich

Die Daten zu diesen Probanden/Patienten gingen in die Originalpublikationen zu dieser Arbeit ein (RITTER et al., 2013; SCHMIDT et al., 2012).

Insgesamt wurden 168 Kinder im Alter von 0-18 Jahren analysiert. Dieses Kollektiv setzt sich zusammen aus 29 Nabelschnurblutproben von Neugeborenen, 30 Kindern, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme jünger als 18 Monate alt waren und 109 Kindern im Alter von 18 Monaten bis 18 Jahren. Die Nabelschnurblutproben wurden nach Lösung der Plazenta aus dem Uterus post partum aus der Nabelschnur entnommen. In der Nabelschnur zirkuliert ausschließlich Blut, welches dem kindlichen Kreislauf entstammt (DIEDRICH et al., 2007). Daher wird der ermittelte Immunstatus des Nabelschnurblutes in dieser Studie mit dem kindlichen Immunstatus gleichgesetzt.

Bis zu einem Alter von 18 Monaten können im kindlichen Blutkreislauf mütterliche Antikörper persistieren (KOTTON et al., 2010). Daher wurde in Zusammenhang mit den in dieser Studie eingeschlossenen Kindern unter 18 Monaten und Neugeborenen das Blut der 59 Mütter dieser Kinder analysiert. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestand weder bei den Müttern noch bei den Kindern die Symptomatik oder der Verdacht einer akuten CMV-Infektion oder CMV-Reaktivierung.

Zusätzlich wurde ein Hämodialysepatient in die vorliegende Studie eingeschlossen, bei dem eine AB0 inkompatible Nierentransplantation durchgeführt wurde (Tabelle 9). Dessen CMV spezifische Immunantwort wurde sowohl vor und nach Verabreichung von humanen

Immunglobulinen (Privigen, Behring 0,35g/kg, hergestellt aus dem Plasma menschlicher Spender), sowie nach Transplantation im Verlauf analysiert.

Potentielle Träger passiver CMV spezifischer Antikörper wurden in der Gruppe der Kinder unter 18 Monate, den Nabelschnurblutproben sowie bei dem Hämodialysepatienten vermutet. Mütter und Kinder über 18 Monate waren von diesem Verdacht ausgeschlossen und dienten in der vorliegenden Studie als Kontrollgruppen.

In den kooperierenden Abteilungen am Universitätsklinikum des Saarlandes (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin, Klinik für Innere Medizin IV) wurden die Blutentnahmen für diese Studie durchgeführt. Die Blutprobengewinnung bei den Kindern erfolgte zusammen mit einer Routine-Blutentnahme. Vor jeder Blutentnahme wurden die Probanden/Patienten, beziehungsweise deren Erziehungsberechtigte ausführlich aufgeklärt und ihr Einverständnis schriftlich festgehalten. Vor Beginn der Studie lag das Ethikvotum der Ärztekammer des Saarlandes vor (26/07 inclusive Amendment).

Die im Rahmen der Studie durchgeführten Analysen erfolgten prospektiv.

3.6 Quantifizierung Antigen spezifischer T-Zellen aus Vollblut

Die Quantifizierung Antigen spezifischer T-Zellen erfolgt direkt aus dem Vollblut anhand der Zytokin-Induktion nach Stimulation mit spezifischen Antigenen. Die durch T-Zell-Stimulation erhaltene Zytokin-Induktion wird durch einen spezifischen Stimulus in Kombination mit kostimulatorisch wirksamen Antikörpern erreicht, die zu einer Steigerung des spezifischen Signals beitragen. Für jede Probandenprobe wird ein kommerziell verfügbares Lysat CMV infizierter Fibroblasten (CMV-Antigen), ein entsprechendes Kontroll-Antigen nicht infizierter Fibroblasten, welches als Negativkontrolle dient, sowie eine Positivkontrolle als Stimulus verwendet. Zur Positivkontrolle wird das zu den Superantigenen gehörende *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) eingesetzt. SEB bindet direkt an V β -Ketten des T-Zellrezeptors (TCR) von T-Lymphozyten und gleichzeitig an die MHC II-Moleküle auf Antigen präsentierenden Zellen (APCs) und führt als Folge dessen zu einer Antigen unabhängigen polyklonalen Stimulation von T-Zellen mit resultierender sehr starker Zytokinproduktion. Superantigene sind die potentesten Aktivatoren der menschlichen T-Lymphozyten. Daher ist durch diesen Stimulus erkennbar, ob ein Proband grundsätzlich in der Lage ist, eine Reaktion zu bilden. Um die spezifisch induzierten Zytokine, die als Reaktion auf die Stimulation

gebildet werden, Zell assoziiert analysieren zu können, erfolgt nach 2h die Zugabe von Brefeldin A. Brefeldin A interferiert im retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum (ER). Daher kommt es zur Anreicherung von sekretorischen Proteinen (zum Beispiel von Interferon- γ oder anderen Zytokinen) im ER, die dann in der späteren durchflusszytometrischen Analyse intrazellulär nachgewiesen werden können.

3.6.1 Antigen spezifische T-Zell-Stimulation im Vollblut

Alle Konzentrationsangaben zur Stimulation beziehen sich auf 1ml heparinisiertes Vollblut. Zunächst wird das benötigte Blutvolumen mit je 1 μ g/ml kostimulatorischem Antikörper anti-CD28 und anti-CD49d durchmischt. Anschließend werden pro Stimulation 300 μ l Blut (Kinder <18 Monate) bzw. 450 μ l Blut (ältere Kinder und Erwachsene) auf je drei Polypropylen-Röhrchen verteilt. Pro Stimulationsansatz wird das jeweilige Antigen zupipettiert (32 μ l/ml Ko-Ag; 32 μ l/ml CMV-Ag; 2,5 μ g/ml SEB). Nach gründlichem Mischen folgt im Brutschrank eine 2 stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ der aufrecht stehenden Röhrchen mit lose angeschraubten Deckeln. Nach anschließender Zugabe von 10 μ g/ml Brefeldin A werden die Proben erneut gemischt und weitere 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ aufrecht mit lose angeschraubten Deckeln im Brutschrank inkubiert.

3.6.2 Fixierung der stimulierten Proben

Um Zell-Zell-Interaktionen zu lösen werden die stimulierten Proben mit 2mM EDTA versetzt, 10sec auf dem Vortex-Mixer durchmischt und anschließend 15min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach werden 9ml Lysing-Lösung pro ml Vollblut hinzugegeben und kurz gemischt, um Erythrozyten zu lysieren und Leukozyten zu fixieren. Nach 10 minütiger Inkubation erfolgt eine Zentrifugation der Proben für 7min bei 1300 Umdrehungen pro Minute (U/min). Anschließend wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet durch kräftiges Bewegen des Polypropylen-Röhrchens auf einem Metallgitter von der Gefäßwand gelöst und in 2ml FACS-Puffer resuspendiert (Waschschritt). Die Proben werden erneut 7min bei 1300U/min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wird das Zellpellet wiederum gelöst, in 400 μ l FACS-Puffer aufgenommen und bis zur durchflusszytometrischen Färbung (max. 72h später) bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.6.3 Durchflusszytometrische Färbung mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern

Um eine homogene Zellsuspension zu erreichen, werden die Proben kurz durchmischt. In der

vorliegenden Studie wurden pro Stimulationsansatz zwei Färbungen durchgeführt. Generell werden pro Färbung 200µl Zellsuspension auf die FACS Röhrchen verteilt und durch Zugabe von 2ml Saponin-Puffer permeabilisiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wird der Ansatz 7min bei 1300U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und pro Probe 50µl der entsprechenden Antikörper-Mischung hinzupipettiert. Zunächst werden die Zellen nach CMV spezifischer Stimulation sowie Negativ- und Positivkontrolle mit Antikörpern gegen CD4, CD69, IL-2, IFN-γ und TNF-α markiert (s. Tabelle 10, Färbung 1). Bei den Probanden, die in der daraus resultierenden Messung mehr als 0,03% CMV spezifische Zellen (definiert als Anteil IFN-γ⁺/CD69⁺ Zellen an Gesamt-CD4⁺ T-Zellen) aufweisen und bei allen SEB-Stimulationsansätzen, werden zusätzlich 200µl Zellsuspension mit einem Antikörpermix aus anti-CD4-, anti-CD69-, anti-IL-4- und anti-IL-17-Antikörpern gefärbt (s. Tabelle 10, Färbung 2). Nach erneutem Durchmischen werden die Proben 30-45min im Dunkeln bei RT inkubiert, anschließend 3ml FACS-Puffer zugegeben und erneut 7min bei 1300U/min zentrifugiert. Der Überstand wird erneut abgesaugt. Danach werden jeweils 150µl 1% PFA hinzugefügt, gemischt und die Proben bis zur durchflusszytometrischen Messung bei 4°C maximal 24 Stunden gelagert.

Tabelle 10: Färbeansätze (Färbung 1 und Färbung 2)

Komponenten Färbung 1	Fluorochrom	Menge [µl]
anti-CD4 Antikörper	Pe-Cy7	0,5
anti-CD69 Antikörper	PerCP	2
anti-IL-2 Antikörper	PE	2
anti-IFN-γ Antikörper	FITC	0,5
anti-TNF-α Antikörper	APC	0,15
Saponin 5%		1
FACS Puffer		43,85
Gesamt		50

Komponenten Färbung 2	Fluorochrom	Menge [μ l]
anti-CD4 Antikörper	Pe-Cy7	0,5
anti-CD69 Antikörper	PerCP	2
anti-IL-4 Antikörper	PE	2
anti-IL-17 Antikörper	AlexaFluor647	2,5
Saponin 5%		1
FACS Puffer		42
Gesamt		50

3.7 Durchflusszytometrie/FACS

Die englische Bezeichnung für Durchflusszytometrie lautet fluorescence-activated cell sorting, abgekürzt FACS. Mit ihrer Hilfe kann man Zellen charakterisieren, sowohl quantitativ als auch qualitativ. In der vorliegenden Arbeit werden Zellen aus Vollblut stimuliert, fixiert und anschließend gefärbt. Nach dieser Vorarbeit werden die Zellen dem Durchflusszytometer präsentiert. Dieses saugt die angebotene Zellsuspension mittels eines Stahlröhrchens an. Im Innern des Geräts wird die angesaugte Suspension mit einem gewissen Druck durch eine Kapillare gepresst, sodass ein Strom von einzelnen Zellen entsteht. Den Messbereich müssen die Zellen vereinzelt durchströmen, denn hier treffen verschiedene Laserstrahlen die Zellen, wodurch es an der Zelle zu einer Streuung des auftreffenden Lichts kommt. Die Größe der Zellen wirkt sich auf das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) aus. Die Komplexität der Zelle (Größe und Struktur des Zellkerns, Menge der Vesikel) hat Auswirkungen auf das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter). Mit der Streulicht-Analyse (FSC, SSC) können ungefärbte Zellen gut voneinander unterschieden werden. Zellbruchstücke zeigen eine geringe Vorwärtsstreuung, weil sie kleiner sind als erhaltene Zellen und können so leicht abgegrenzt werden. Große raue Granulozyten, die in ihrem Inneren viele Vesikel aufweisen, führen zu einer anderen Lichtstreuung als die kleinen glatten Lymphozyten, die wenige Vesikel besitzen. Wenn Zellen Fluorochrom gekoppelte Antikörper gebunden haben, kommt es neben der Streuung des auftreffenden Lichts zu einer Aussendung von Fluoreszenzimpulsen. Eine genaue Identifizierung von Lymphozyten erfolgt im Rahmen dieser Arbeit über Fluorochrom gekoppelte Antikörper, die gegen

spezifische Marker dieser Zellpopulation gerichtet sind. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Wenn eine mit Fluorochrom gekoppeltem Antikörper beladene Zelle den Messbereich des Durchflusszytometers durchströmt, werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch das Anregungslicht auf ein höheres Energieniveau gehoben. Das Emissionslicht wird ausgesendet, wenn die Elektronen daraufhin auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurückfallen. Photodetektoren erfassen dieses Emissionslicht, der Computer analysiert die Information. Zelltyp spezifische Marker gegen die Fluorochrom gekoppelte Antikörper gerichtet sind, können membranständige Rezeptoren wie CD4 oder CD8 oder intrazelluläre Zytokine sein. Bestandteile aus dem Zellinneren können natürlich erst nach Permeabilisierung der Zellmembran charakterisiert werden. Bei der Interpretation ausschlaggebend ist der Anteil der Zellmarker auf oder in der T-Zelle, als auch die Expressionsdichte in beiden Bereichen. Die verwendeten Fluorochrome besitzen zum Teil gleiche Anregungswellenlängen aber unterschiedliche Emissionswellenlängen. Ein Laser reicht aus um unter Verwendung von verschiedenen Fluorochrom gekoppelten Antikörpern mehrere Zelleigenschaften zu analysieren. Mehrere Laser mit verschiedenen Anregungswellenlängen, wie es für moderne FACS-Geräte üblich ist, erlauben eine noch detailliertere Zell-Analyse. Tabelle 11 listet die in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome mit ihren im Laboralltag verwendeten Abkürzungen auf.

Tabelle 11: Anregungs- und Emissionswellenlängen der in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome

Fluorochrom		Wellenlänge (nm)	
Kurzbezeichnung	Name	Anregung	Emission
AlexaFluor 647	Allophycocyanin Fluoresceinisothiocyanat Phycoerythrin Phycoerythrin Cyanin 7 Peridinin Chlorophyll Protein	650	668
APC		650	660
FITC		494	520
PE		496	578
PE-Cy7		496	785
PerCP		482	678

Die Auswertung der erhobenen Parameter erfolgte mit der BD FACS Diva Software. Zur Darstellung mehrerer Parameter pro Zelle dienen Standardpunktdiagramme (Dotplots), die gemäß ihrer zwei Achsen zwei unterschiedliche Zellmarker darstellen. In Dotplots wird für jede Zelle ein Punkt gesetzt. Mit einer Auswertstrategie ist es möglich die einzelnen Dotplots in ihrer Darstellung miteinander zu verknüpfen und in eine Hierarchie einzubauen (MURPHY et al., 2009).

3.7.1 Messung und Auswertung am Durchflusszytometer

Die Proben wurden im Durchflusszytometer FACS Canto II gemessen. Dabei wurden pro Probe 10000-50000 $CD4^+$ T-Zellen erfasst. Die anschließende Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der FACS Diva Software (Version 6.1.3) unter Anwendung verschieden erstellter Strategien (Abbildung 2). Die gemessenen Leukozyten kann man zunächst über den Vorwärts- und Seitwärts-Scatter in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten unterteilen. In der vorliegenden Arbeit werden CMV spezifische $CD4^+$ T-Zellen als IFN- γ /CD69 doppelt positiv definiert. Probanden ab einer Frequenz von 0,03% CMV spezifischer Zellen werden als CMV positiv angesehen. Die CMV spezifischen $CD4^+$ T-Zellen (IFN- γ^+ /CD69 $^+$) wurden mit Hilfe der in Abbildung 2 dargestellten Strategie auf ihre Fähigkeit zur Produktion der Zytokine IL-2 und TNF- α untersucht. Die Expression der Zytokine IL-2 und TNF- α wurde auch in CD69 $^+$ /IFN- $\gamma^{-(negativen)}$ $CD4^+$ T-Zellen untersucht, sodass abschließend ermittelt werden

konnte, wie viele $CD4^+$ T-Zellen alle drei Zytokine, zwei Zytokine oder lediglich eines der Zytokine exprimieren.

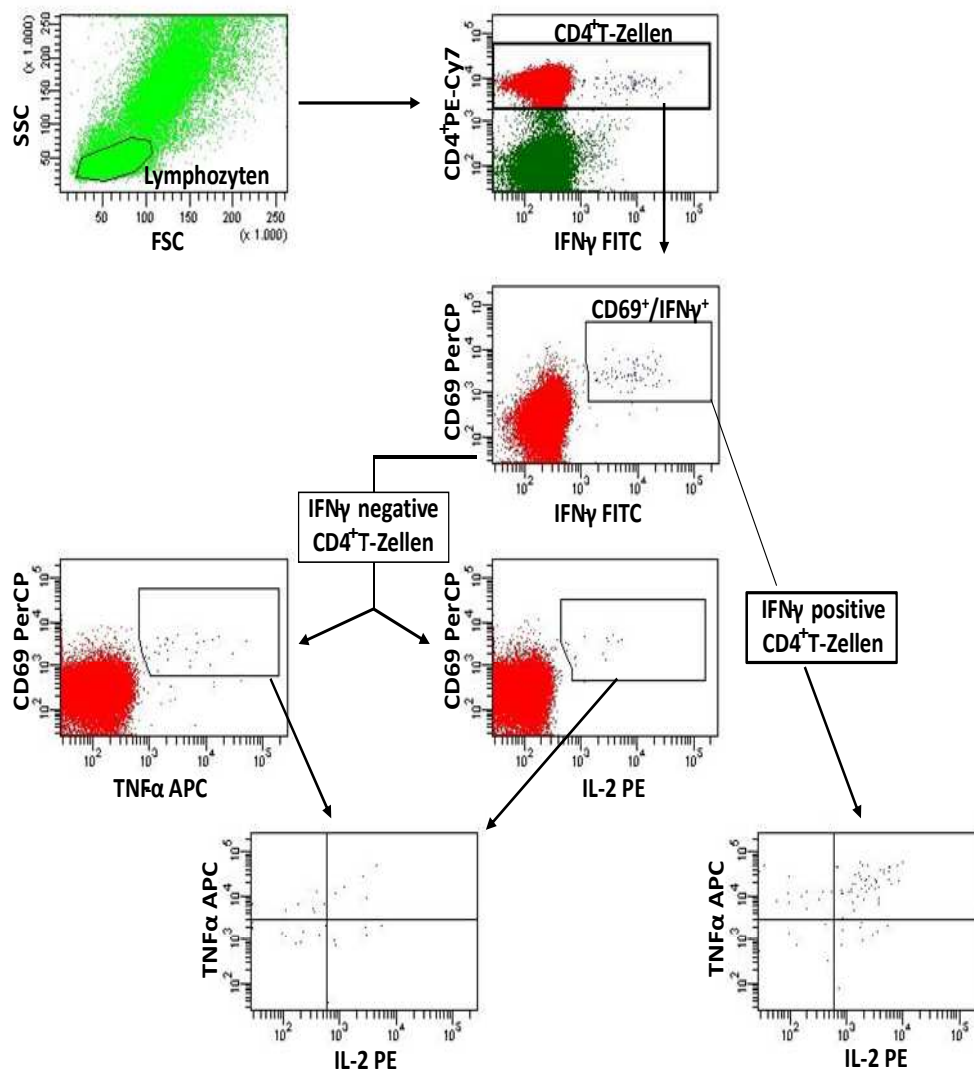


Abbildung 2. Auswertstrategie der durchflusszytometrischen Analyse der intrazellulären IFN- γ -, IL-2- und TNF- α -Färbung. Bei der Lymphozytenpopulation beginnend werden die CD69, IFN- γ positiven $CD4^+$ T-Zellen sowie die IFN- γ negativen $CD4^+$ T-Zellen so aufgeteilt, dass diese Subpopulationen separat voneinander bezüglich ihres TNF- α - und IL-2-Signals analysiert werden können. (FSC: Vorwärtsscatter; SSC: Seitwärtsscatter). Die Gatingstrategie wurde von (SCHUB, 2011) übernommen.

Die Auswert-Strategie zu Färbung 2 (s. Tabelle 10) ist in Abbildung 3 dargestellt. Dabei werden ausgehend von den Lymphozyten $CD4^+$ T-Zellen zur weiteren Analyse eingegrenzt. In Analogie zu Färbung 1 wird untersucht, ob sich unter den aktivierten (CD69 positiven) $CD4^+$ T-Zellen eine IL-4- und/oder IL-17-Produktion detektieren lässt.

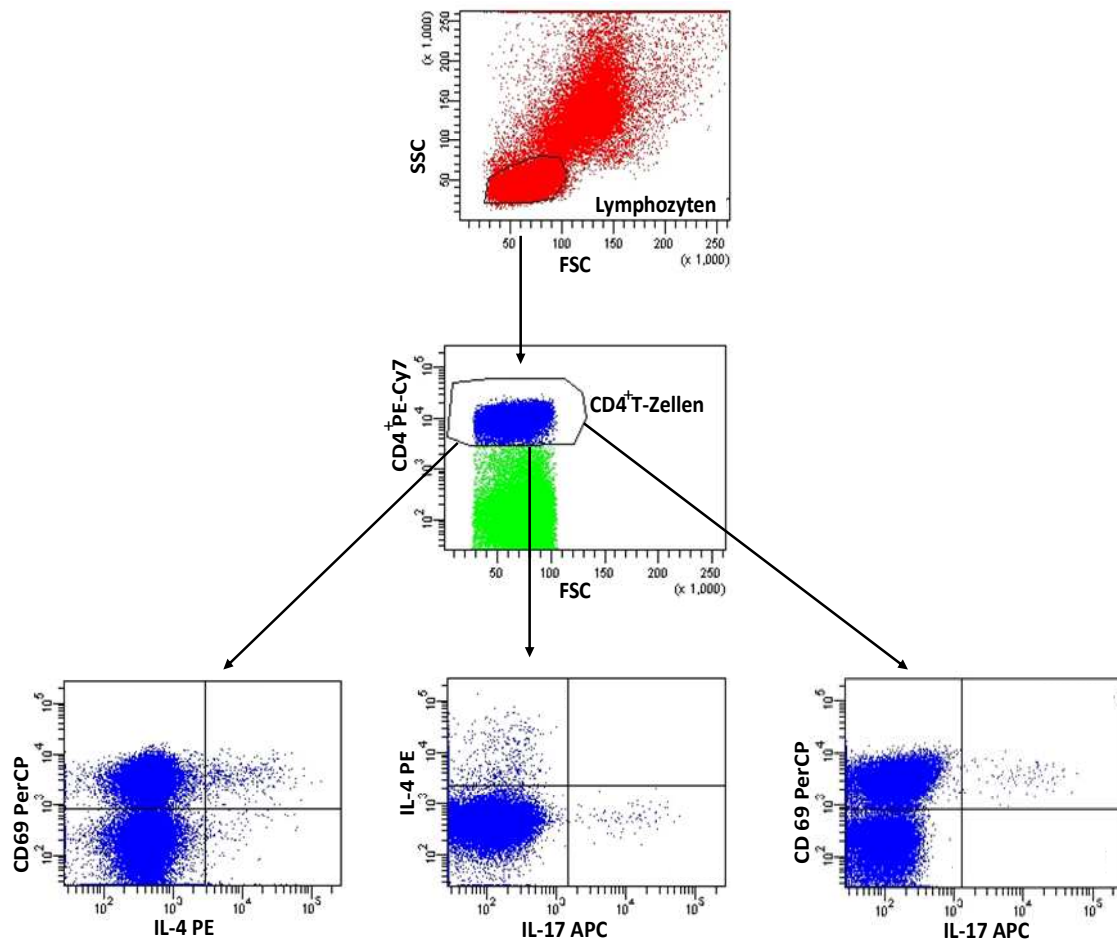


Abbildung 3. Auswertstrategie zur durchflusszytometrischen Analyse der intrazellulären IL-4- und IL-17-Färbung $CD4^+$ T-Zellen nach Antigen spezifischer Stimulation. Ausgehend von der Lymphozytenpopulation werden alle $CD4$ positiven T-Zellen bezüglich ihrer IL-4-Produktion und ihrer IL-17-Produktion untersucht. Außerdem ist die IL-4- gegen die IL-17-Produktion aufgetragen. (FSC: Vorwärtsscatter; SSC: Seitwärtsscatter).

3.8 Quantitativer Anti-CMV-IgG-ELISA

Mit einem enzyme-linked immunosorbent assay können in Serumproben befindliche Antikörper detektiert werden. Dazu macht sich der ELISA den Mechanismus der Antigen-Antikörper-Reaktion zu Nutze. Auf dem Boden einer Mikrotiterplatte haften Virusantigene, an die im Serum vorhandene Antikörper spezifisch binden. Die gebundene Antikörperklasse wiederum (hier Immunglobulin G (IgG)) wird durch anschließend zugegebene Enzym gekoppelte Anti-Human-Antikörper gebunden. Wenn diesem gebundenen Enzym gekoppelten Antikörper ein Enzymsubstrat zur Verfügung gestellt wird, kommt es zu einer Enzym katalysierten Reaktion (Farbumschlag), mit der der Serumantikörper nachgewiesen werden kann. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Anti-CMV-ELISA von Euroimmun weist anti-CMV spezifische IgGs mit Peroxidase markierten Anti-Human-IgGs nach. Eine zunächst farblose Chromogen/Substrat-Lösung wird von der Peroxidase in eine blaufarbene

Lösung umgewandelt. Die abschließende Zugabe einer Stopplösung führt zu einer Umwandlung in eine gelbe Lösung, die im Photometer gemessen wird (MURPHY et al., 2009).

3.8.1 Durchführung des quantitativen Anti-CMV-IgG-ELISA

Heparinisiertes Vollblut wird 10min bei 3000U/min zentrifugiert. Um das gewonnene Serum über einen längeren Zeitraum lagern zu können, wurden die Proben bei -20°C eingefroren. Zur Durchführung des ELISA müssen die Serumproben wieder aufgetaut werden. Es werden 10µl der jeweiligen Serumprobe mit 1000µl Probenpuffer verdünnt. Jeweils 100µl Kalibrator, Positiv-, Negativkontrolle und verdünnte Probe wird in die Reagenzgefäße einer Mikrotiterplatte überführt. Diese sind mit CMV-Antigen beschichtet. Die Mikrotiterplatte wird so 30min bei RT inkubiert. Danach werden die Reagenzgefäße entleert und mit jeweils 300µl gebrauchsfertigem Waschpuffer versehen. Nach nur 30-60sec wird der Waschpuffer entfernt. Dieser Waschschrift wird dreimal durchgeführt. Damit keine Waschpufferreste auf der Mikrotiterplatte haften bleiben, wird sie ausgeklopft. Je 100µl Peroxidase markiertes Anti-Human-IgG vom Kaninchen (Enzymkonjugat) wird in die Reagenzgefäße pipettiert und 30min bei RT inkubiert. Danach wird die Mikrotiterplatte erneut dreimal gewaschen. Nun werden jeweils 100µl Trimethylbenzidin/H₂O₂ (Chromogen/Substrat-Lösung) den Reagenzgefäßen hinzugesetzt und 15min bei RT inkubiert. Zum Schluss müssen jeweils 100µl 0,5M Schwefelsäure (Stopplösung) auf die Mikrotiterplatte gegeben werden. Die Messung der Proben soll innerhalb von 30min nach Abstoppen erfolgen.

3.8.2 Messung und Auswertung am multifunktionellen Plattenleser

Die Messungen erfolgen mit einer Wellenlänge von 450nm im multifunktionellen Plattenleser Victor X4. Die Referenzwellenlänge liegt dabei zwischen 620nm und 650nm. Mit der WorkOut Software Version 2.5 erfolgt die Auswertung der erhobenen Daten.

3.9 CMV-DNA-Analyse

Die CMV-DNA des Patienten nach Transplantation wurde im Rahmen der klinischen Routinediagnostik im Institut für Virologie mittels quantitativer Polymerase Kettenreaktion (PCR) bestimmt (Cobas Amplicor, Roche Diagnostics, Mannheim). Das klinisch relevante Detektionslimit betrug 400 Kopien/ml.

3.10 Statistische Analysen

Mit dem GraphPad Prism-Programm 5.03 wurden die erhobenen Daten der vorliegenden Studie statistisch ausgewertet. Der Mann Whitney Test wurde für den Vergleich zweier Gruppen ungepaarter nicht parametrischer Werte verwendet. Der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-Test wurde für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen ungepaarter nicht parametrischer Werte herangezogen. Der Spearman-Test diente der Korrelationsanalyse. Die Analyse der Übereinstimmung zwischen Serologie und T-Zellen erfolgte mittels Kappa-Statistik (LANDIS, KOCH, 1977). Alle p-Werte $<0,05$ werden als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis CMV spezifischer CD4⁺ T-Zellen bei CMV seropositiven Probanden ohne passive Antikörpertiter

Zunächst wurde die Methodik zum Nachweis CMV spezifischer CD4⁺ T-Zellen bei Müttern und über 18 Monate alten Kindern mit bekanntem IgG-Serostatus evaluiert. Diese Altersgrenze wurde gewählt, da ab einem Alter von 18 Monaten keine passiven mütterlichen Antikörper mehr zu erwarten sind (KOTTON et al., 2010). Hierzu wurde heparinisiertes Vollblut mit CMV-Antigen versetzt und über einen Zeitraum von 6 Stunden stimuliert. CMV spezifische Zellen wurden als CD69/IFN- γ doppelt positive CD4⁺ T-Zellen charakterisiert. Parallel wurde jeweils der CMV-IgG-Serostatus mittels ELISA bestimmt. Eine Stimulation mit Kontroll-Antigen diente als Negativkontrolle. Zur Ermittlung der Frequenzen CMV spezifischer CD4⁺ T-Zellen wurde die Frequenz reaktiver T-Zellen in der Negativkontrolle jeweils von der Frequenz nach spezifischer Stimulation subtrahiert. Eine Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) diente als Positivkontrolle, die eine Beurteilung der generellen Immunreaktivität erlaubte. Repräsentative Beispiele eines 17-jährigen CMV seropositiven Kindes und einer CMV seropositiven Mutter sind in Abbildung 4A dargestellt, bei denen 0,43% und 1,05% CMV spezifische CD4⁺ T-Zellen nachweisbar waren. Abbildung 4B zeigt das Beispiel eines 8-jährigen CMV seronegativen Kindes und einer CMV seronegativen Mutter, bei denen keine CMV spezifischen CD4⁺ T-Zellen detektierbar waren. Die deutliche Reaktion auf SEB zeigt jedoch, dass die Zellen beider Probanden grundsätzlich zur Zytokinproduktion in der Lage waren.

4.2 Deutliche Übereinstimmung des T-Zell-Tests mit dem Nachweis CMV spezifischer IgG-Antikörper bei Probanden ohne passive humorale Immunität

Im Folgenden wurden größere Kollektive an Probanden analysiert, um die Aussagekraft der CMV spezifischen T-Zell-Messung mit der Serologie zur Bestimmung des CMV-Infektionsstatus zu vergleichen. Hierzu wurden zunächst 59 Erwachsene (Mütter) und 109 Kinder über 18 Monate herangezogen, da in diesen Gruppen keine passive Antikörperimmunität zu erwarten war.

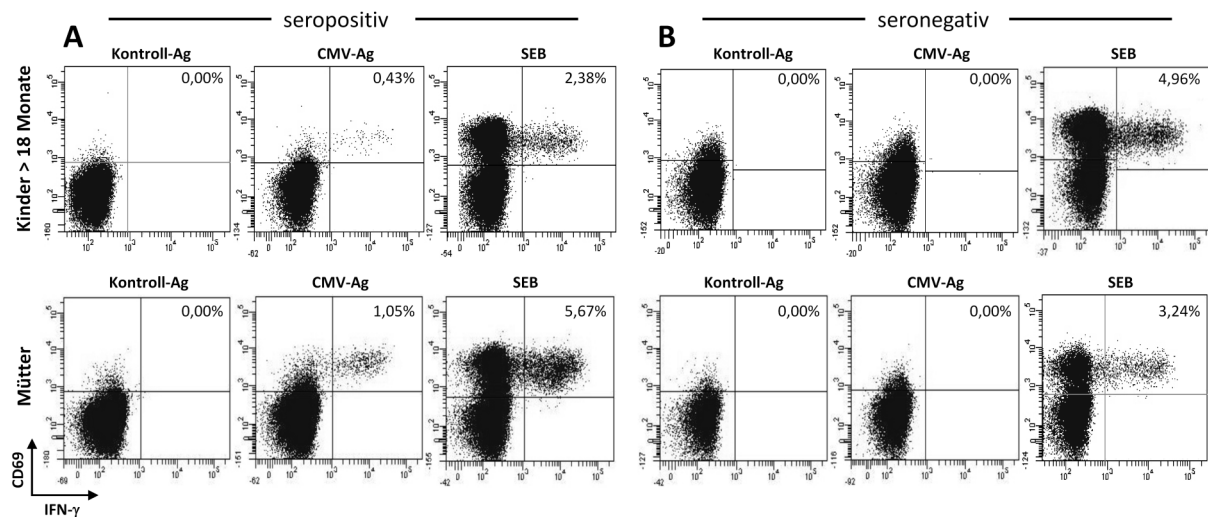


Abbildung 4. Nachweis CMV spezifischer CD4⁺ T-Zellen bei CMV seropositiven Probanden. Die dargestellten Ergebnisse stehen stellvertretend für 109 Kinder über 18 Monate und 59 Erwachsene (Mütter), bei denen ein passiv positiver Antikörperstatus nicht zu erwarten war. Die Ergebnisse der Vollblutstimulation mit Kontroll-Antigen, CMV-Antigen und *Staphylokokkus aureus* Enterotoxin B (SEB) bei (A) CMV seropositiven Probanden und (B) CMV seronegativen Probanden sind als Dotplots dargestellt. CMV spezifische CD4⁺ T-Zellen waren lediglich bei seropositiven Probanden nachweisbar. Die Prozentangaben in den Dotplots zeigen die Frequenzen der CD69/IFN- γ doppelt positiven CD4⁺ T-Zellen an. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (RITTER et al., 2013).

Beim qualitativen Vergleich beider Methoden zeigte sich in beiden Kollektiven eine hohe Übereinstimmung (Abbildung 5). Unter den Kindern wiesen 24 (22,0%) sowohl CMV spezifische IgG als auch T-Zellen auf, während 85 (78,0%) übereinstimmend in beiden Testverfahren negative Ergebnisse zeigten. Diskordante Ergebnisse traten nicht auf (Abbildung 5A, K=1,0; 100% Sensitivität, 100% Spezifität). Auch unter den Müttern war eine sehr deutliche Übereinstimmung in den Ergebnissen beider Testverfahren zu verzeichnen. Verglichen mit Kindern waren Mütter zu einem höheren Prozentsatz serologisch positiv (51,7%, Abbildung 5B) und in allen Proben CMV seropositiver Mütter konnten auch CMV spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise wiesen zwei Mütter klar detektierbare CMV spezifische T-Zellen auf, obwohl die jeweiligen CMV-IgG-Titer unter der Nachweisgrenze lagen. Folglich weist die etablierte serologische Testung in der Gruppe der Mütter eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 92,9% auf (K=0,93, Abbildung 5B). Im Folgenden wurde ebenfalls eine quantitative Analyse CMV spezifischer CD4⁺ T-Zell-Frequenzen bei Müttern und Kindern in Abhängigkeit des Serostatus vorgenommen (Abbildung 5C). Hierbei lagen die Frequenzen CMV spezifischer T-Zellen bei allen CMV seropositiven Kindern über der Nachweisgrenze, der Median der Frequenzen bei Kindern war jedoch signifikant geringer (0,38%; Interquartilbereich (IQR) 1,50%) als der der Mütter

(0,95%; IQR 1,51%; $p=0,005$; Abbildung 5C). Bei den CMV-IgG negativen Probanden lagen die Frequenzen bei allen Kindern ($n=85$) und 26/28 Müttern unterhalb der Nachweisgrenze. Interessanterweise waren die Frequenzen CMV spezifischer T-Zellen bei den beiden Müttern mit negativem IgG-Status geringer als die der CMV-IgG positiven Mütter (Abbildung 5C, 0,10% beziehungsweise 0,23%). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass CMV spezifische T-Zellen in ähnlicher Weise wie die Serologie zur Bestimmung des CMV-Infektionsstatus herangezogen werden können. Der Nachweis CMV spezifischer T-Zellen bei 2 von 28 seronegativen Müttern könnte sogar auf eine höhere Sensitivität des T-Zell-Tests zur Diagnose eines positiven CMV-Infektionsstatus hinweisen.

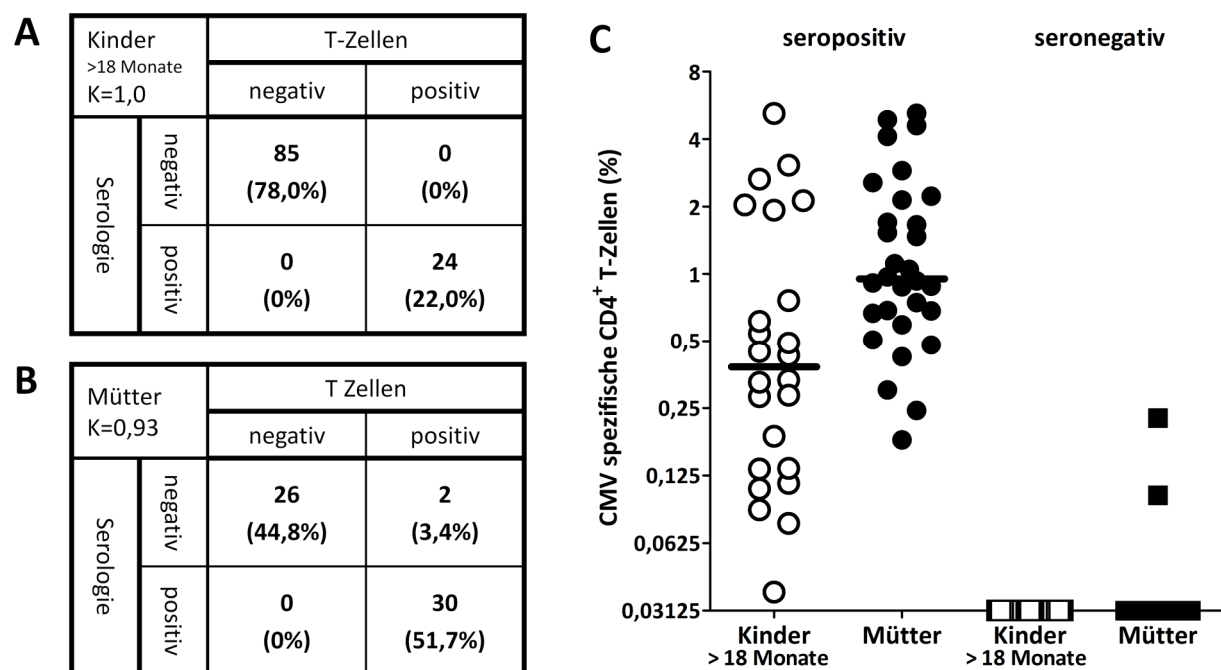


Abbildung 5. Kongruente Ergebnisse zwischen Serologie und T-Zell-Test bei Probanden ohne passive Immunität. CMV-Status-Analyse durch den Vergleich zwischen Serologie und T-Zell-Test bei (A) Kindern über 18 Monaten und (B) Erwachsenen (Mütter). In beiden Gruppen war eine passive Immunität unwahrscheinlich. (C) Jedes Symbol steht für einen Probanden, die Linien bilden die medianen Frequenzen der CMV spezifischen $CD4^+$ T-Zellen ab. Ergebnisse über 0,03% CMV spezifischer $CD4^+$ T-Zellen wurden positiv bewertet. Die Probe einer seronegativen Mutter mit einer überschießenden Reaktivität in der Negativ-Kontrolle wurde aus dieser Analyse ausgeschlossen, da der T-Zell-Status nicht eindeutig bestimmbar war. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (RITTER et al., 2013).

4.3 Kein Nachweis CMV spezifischer $CD4^+$ T-Zellen in Nabelschnurblut reifer, gesunder Neugeborener

Da anzunehmen ist, dass sich CMV spezifische T-Zellen bei gesunden Neugeborenen erst im Verlauf nach Geburt im Zuge eines CMV-Erstkontaktes entwickeln, sollten bei Neugeborenen allenfalls passiv transferierte Antikörper der Mutter, nicht jedoch CMV spezifische T-Zellen

nachweisbar sein. Daher wurden im Folgenden 29 Nabelschnurblutproben als weitere Kontrollen für eine Gruppe von Kindern untersucht, bei denen keine CMV spezifische T-Zellen zu erwarten sind. Hierzu wurden die Ergebnisse mit dem Serostatus der zugehörigen Mütter (n=28, davon eine Zwillingmutter) verglichen. Wie erwartet konnten in keiner der Nabelschnurblutproben CMV spezifischen T-Zellen detektiert werden (Abbildung 6). Um herauszufinden, ob unter diesen T-Zell negativen Nabelschnurproben auch Träger eines passiven Antikörpertiters gegen CMV vorhanden sind, wurde zusätzlich der Serostatus untersucht. Elf der 29 untersuchten Nabelschnurproben zeigten CMV spezifische IgG (Abbildung 6A), die ausnahmslos bei CMV seropositiven Müttern zu finden waren. Es zeigte sich weiterhin, dass es keine seropositive Mutter gab, bei der der Titer passiv übertragener CMV spezifische IgG im zugehörigen Kind unter der Nachweisgrenze lag. Folglich zeigten alle Mütter-Nabelschnur-Paare denselben Serostatus (Abbildung 6B). Dies zeigt, dass ein existierender mütterlicher CMV-IgG-Antikörpertiter in allen Fällen auf das Kind übertragen wurde, sodass bei allen Kindern CMV seropositiver Mütter unmittelbar nach Geburt von einem passiven Antikörpertiter auszugehen ist.

		T-Zellen Nabelschnurblut	
		negativ	positiv
Serologie Nabelschnurblut	negativ	18 (62,1%)	0 (0%)
	positiv	11 (37,0%)	0 (0%)

		Serologie Mütter	
		negativ	positiv
Serologie Nabelschnurblut	negativ	18 (62,1%)	0 (0%)
	positiv	0 (0%)	11 (37,0%)

Abbildung 6. In Nabelschnurblutproben gesunder Neugeborener konnten keine CMV spezifischen CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. (A) Vergleichende Analyse zwischen CMV spezifischer humoraler und zellulärer Immunität bei Neugeborenen (Nabelschnurblut). (B) Vergleich der Serologie zwischen Neugeborenen (Nabelschnurblut) und dazu gehörenden Müttern. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (RITTER et al., 2013).

4.4 CMV spezifische CD4⁺ T-Zellen lassen bei seropositiven Kindern unter 18 Monaten einen tatsächlich positiven CMV-Status erkennen

Im Folgenden wurden Kinder unter 18 Monaten rekrutiert, bei denen der tatsächliche CMV-Status aufgrund der potentiell passiven mütterlichen Immunität nicht eindeutig zu bestimmen ist. Hierzu wurden insgesamt 30 Kinder unter 18 Monate vergleichend auf CMV spezifische T-Zellen und Antikörper getestet (Abbildung 7). 17 Kinder (56,7%) waren

seronegativ und keines dieser Kinder wies CMV spezifische T-Zellen auf. Bei 13 Kindern konnte ein positives serologisches Ergebnis detektiert werden. Von diesen 13 Kindern waren bereits in acht Fällen (61,5%) schon CMV spezifische T-Zellen nachweisbar. Demgegenüber waren bei 5/13 serologisch positiven Kindern keine CMV spezifischen T-Zellen messbar, was auf das Vorliegen einer passiven Immunität schließen lässt (Abbildung 7A). Originalmessungen eines dieser Kinder (1,1 Monate) sowie der zugehörigen Mutter (Alter 24,7 Jahre) sind repräsentativ für alle fünf Kinder mit passiv mütterlichem Antikörpertiter in einer Dotplot-Darstellung visualisiert (Abbildung 7B). Diese zeigt deutlich, dass die Mutter CMV spezifische CD4⁺ T-Zellen aufweist, während dies beim Kind nicht der Fall ist. Eine generell eingeschränkte Immunreaktivität bei dem Kind ist auszuschließen, da nach Stimulation mit SEB eine deutliche T-Zell-Reaktion messbar war (Abbildung 7B). Weiterhin ist beispielhaft ein serologisch positives Mutter-Kind-Paar dargestellt, bei dem sowohl bei dem 9,7 Monate alten Kind als auch bei der Mutter (26,8 Jahre) CMV spezifische T-Zellen messbar waren (Abbildung 7C). Interessanterweise waren seropositive Kinder, die bereits eine CMV spezifische zelluläre Immunantwort aufwiesen, tendenziell etwas älter als seropositive, bei denen keine CMV spezifische T-Zell-Antwort nachweisbar war ($0,81 \pm 0,60$ vs. $0,56 \pm 0,68$ Jahre); wenngleich der Unterschied nicht statistisch signifikant war ($p=0,50$), passt diese Beobachtung zu der Tatsache, dass eine CMV-Infektion mit zunehmendem Lebensalter wahrscheinlicher wird.

4.5 IFN- γ ist in allen Altersgruppen das beste Readout-Zytokin bei der CMV spezifischen CD4⁺ T-Zell-Analyse

Die bisher vorgestellten Ergebnisse charakterisieren CMV spezifische CD4⁺ T-Zellen über den Nachweis der IFN- γ -Produktion in aktivierten CD69 positiven Zellen. Probanden, die nach CMV spezifischer Stimulation keine CD69/IFN- γ positiven Zellen aufwiesen, wurden hinsichtlich des T-Zell-Status als CMV negativ eingestuft. Neben der CMV spezifischen Stimulation diente die polyklonale Stimulation mit SEB dem Nachweis, dass CMV negative Probanden grundsätzlich in der Lage waren, CD69/IFN- γ positive Zellen zu bilden. Bei den meisten Nabelschnurproben und einigen Kindern unter 18 Monaten lag nach polyklonaler Stimulation mit SEB jedoch ebenfalls keine IFN- γ -Produktion vor. Diese Beobachtungen ließen daher den Verdacht aufkommen, dass Zellen von Probanden der jungen Altersgruppe eine generell eingeschränkte Fähigkeit zur Zytokinproduktion aufweisen.

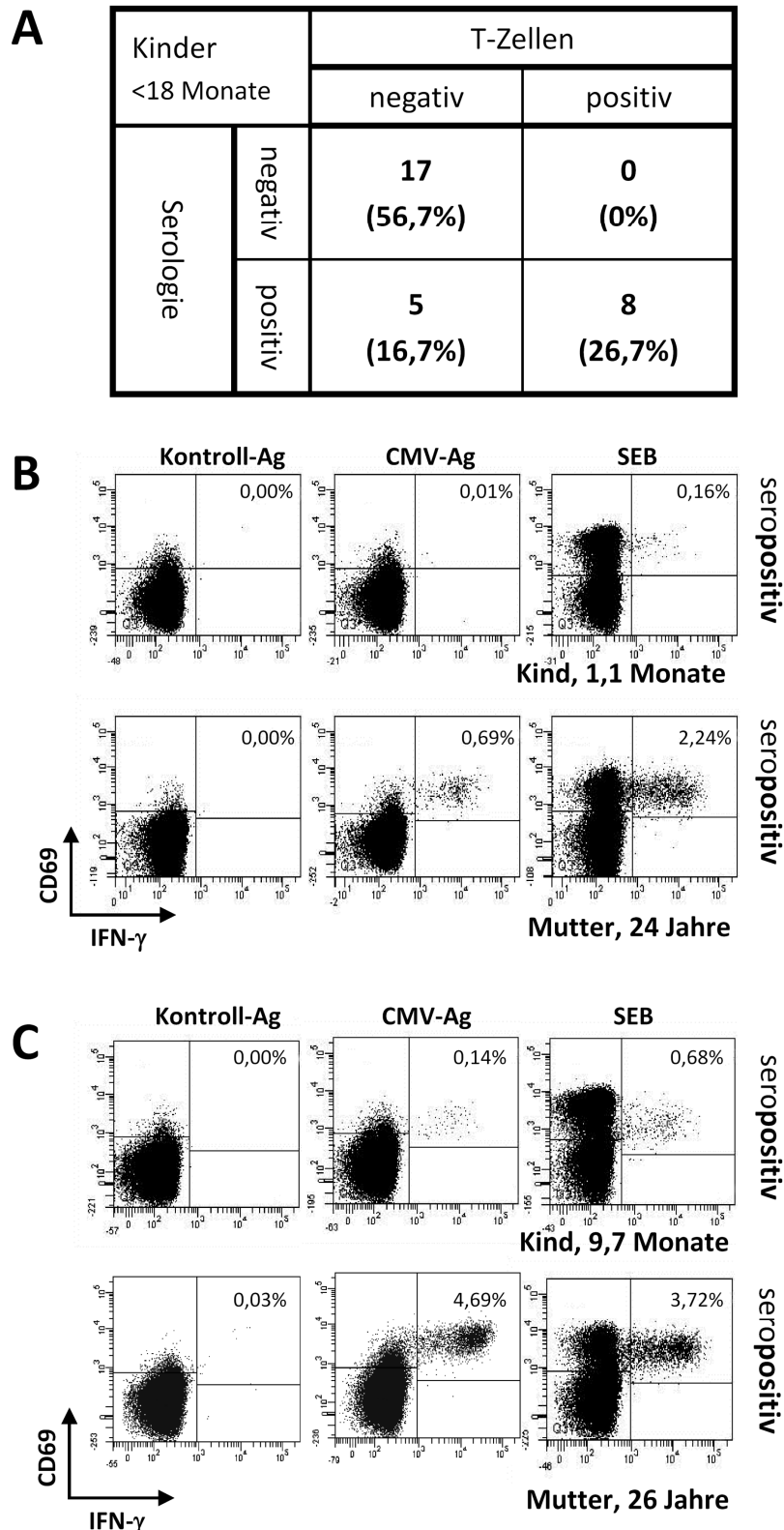


Abbildung 7. Bei potentiell bestehender passiver mütterlicher Immunität (Kinder unter 18 Monate) kann der CMV-Infektionsstatus durch Analyse CMV spezifischer CD4⁺ T-Zellen bestimmt werden. (A) Vergleichende Analyse zwischen humoraler und zellulärer Immunität bei Kindern unter 18 Monaten. (B) Stellvertretendes Beispiel eines Kindes unter 18 Monate mit vermuteter passiver Immunität (seropositiv, T-Zell negativ) und seiner serologisch sowie T-Zell positiven Mutter. (C) Stellvertretendes Beispiel eines Kindes (unter 18 Monate) und seiner Mutter, die beide serologisch und T-Zell positiv sind. Die Prozentangaben in den Dotplots beziffern die Frequenzen der CD69/IFN- γ doppelt positiven CD4⁺ T-Zellen. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (RITTER et al., 2013).

Daraufhin analysierten wir, inwieweit nach CMV spezifischer Stimulation andere Zytokine wie TNF- α , IL-2, IL-4 und IL-17 induziert werden. Neben TH1-Zellen werden dadurch auch TH2- und TH17-Zellen erfasst. Es sollte untersucht werden, ob die zusätzliche Analyse dieser Zytokine besonders in der jungen Altersgruppe zu einem Anstieg der Sensitivität des über IFN- γ definierten T-Zell-Tests führen kann. Abbildung 8 stellt die Ergebnisse dieser CMV spezifischen Zytokinanalyse grafisch in den verschiedenen Altersgruppen dar. Es zeigt sich, dass die Probanden, die nach CMV spezifischer Stimulation IFN- γ produzieren, auch in den meisten Fällen ein positives Ergebnis für TNF- α und IL-2 (TH1-Zytokine) aufweisen (Abbildung 8B). Demgegenüber war in der Gruppe derer, die kein IFN- γ produzieren, auch keine starke Produktion von TNF- α und IL-2 nachweisbar (Abbildung 8A, 25 von 27 Müttern und 83 von 85 Kindern). Folglich bietet weder TNF- α noch IL-2 eine zusätzliche, von IFN- γ unabhängige Evidenz für eine Präsenz CMV spezifischer T-Zellen bei Probanden, die keine IFN- γ -Produktion aufweisen (Abbildung 8B). IFN- γ scheint daher in allen Altersgruppen ein sehr gutes Readout-Zytokin zur Identifizierung CMV spezifischer T-Zellen zu sein. Nach CMV spezifischer Stimulation zeigte eine qualitative Analyse von dreifach (IFN- γ , IL-2, TNF- α), zweifach und einfach Zytokin positiven Zellen, dass die CMV spezifische T-Zell-Antwort in allen Altersgruppen durch IFN- γ dominiert wird (Abbildung 8C, schwarze Balken). Interessanterweise zeigten CMV reaktive T-Zellen von Kindern unter 18 Monaten, bei denen anzunehmen ist, dass die zeitliche Nähe zum CMV-Primärinfekt am größten ist, einen geringeren Prozentsatz an multifunktionalen, dreifach positiven und einen gleichzeitig höheren Prozentsatz von IFN- γ einfach positiven T-Zellen (Abbildung 8C, rechts unten). Weiterhin zeigt ein Vergleich der medianen T-Zell-Frequenzen über die verschiedenen Altersgruppen, dass der Anteil Zytokin produzierender CMV spezifischer T-Zellen bei jungen Kindern am geringsten ist und mit zunehmendem Alter signifikant ansteigt (Abbildung 8B, $p=0,0008$ für IFN- γ positive T-Zellen).

In der Gruppe derer, die IFN- γ produzieren, wurde eine CMV spezifische IL-4-Produktion nur bei 15 von 32 Müttern, bei 9 von 21 Kindern über 18 Monaten und bei keinem der Kinder unter 18 Monaten beobachtet (Daten nicht gezeigt). Eine CMV spezifische IL-17-Produktion war generell nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

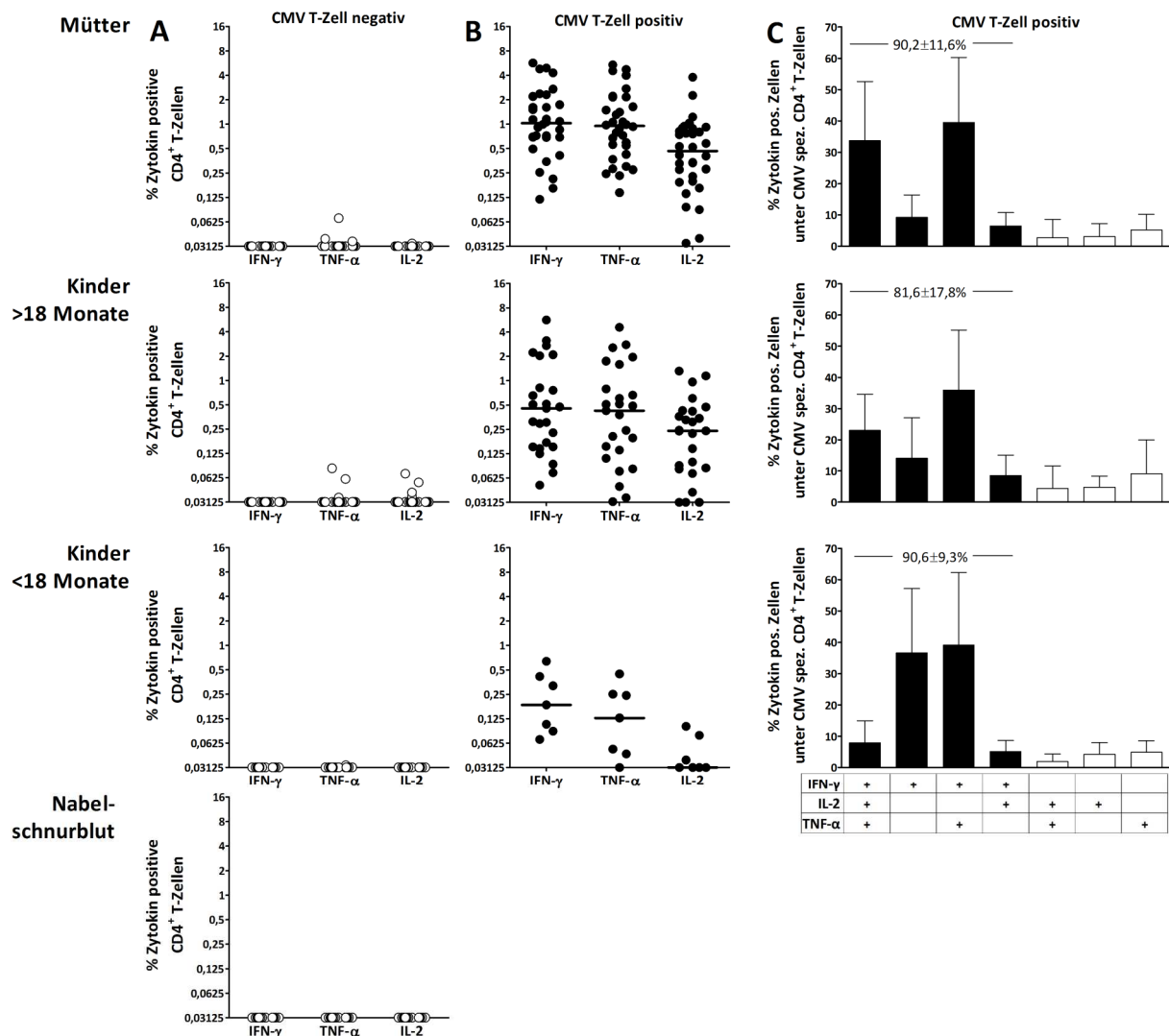


Abbildung 8. In allen Altersgruppen ist IFN- γ das beste Readout-Zytokin zum Nachweis einer CMV spezifischen CD4⁺ T-Zell-Immunität. Dargestellt ist die CMV spezifische Bildung von IFN- γ , TNF- α und IL-2 bei Müttern und allen Kindern bis 18 Jahre, die nach CMV spezifischer Stimulation nicht (A) oder mit (B) einer IFN- γ -Produktion reagieren. Der prozentuale Anteil CMV spezifischer T-Zellen, die IFN- γ , TNF- α oder IL-2 produzieren, steigt mit zunehmendem Alter an (IFN- γ : $p=0,0008$, TNF- α : $p=0,0003$, IL-2: $p=0,0001$). Jeder Punkt repräsentiert einen Studienprobanden, die medianen Frequenzen CMV spezifischer CD4⁺ T-Zellen sind durch horizontale Linien dargestellt. (C) Der Zytokin-Vergleich unter CMV reaktiven CD4⁺ T-Zellen offenbart die Dominanz IFN- γ positiver T-Zellen (schwarze Balken zeigen die CMV spezifischen Subpopulationen, die eine IFN- γ -Produktion mit oder ohne gleichzeitige Generierung von IL-2 und/oder TNF- α aufweisen). Die Daten sind als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. Von den acht Kindern unter 18 Monaten mit nachweisbarer CMV spezifischer Immunität, standen nur sieben für diesen zusätzlichen Zytokinprofiltest zur Verfügung, da von einem Kind nicht genügend Blut entnommen werden konnte. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (RITTER et al., 2013).

4.6 Kinder unter 18 Monaten mit CMV spezifischer CD4⁺ T-Zell-Immunität weisen im Vergleich zu T-Zell immunologisch negativen Kindern derselben Altersgruppe stärkere polyklonale Reaktionen der TH1- und TH17-Zellen auf

Um zu analysieren, inwieweit Nabelschnurblutproben oder Proben einiger Kinder unter 18 Monaten generell in ihrer Reaktivität auf andere Stimuli eingeschränkt sind, wurde die

Induktion der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17 und IL-4 nach polyklonaler Stimulation mit SEB analysiert (Abbildung 9). Die Auswertung der T-Zell-Reaktivität erfolgte wie zuvor in den verschiedenen Altersgruppen und separat für Probanden, die auf Basis des Nachweises von IFN- γ nach CMV spezifischer Stimulation keine CMV spezifischen CD4⁺ T-Zellen aufwiesen (weiße Punkte) und für Probanden, bei denen CMV spezifische T-Zellen nachweisbar waren (schwarze Punkte). Unten den Kindern unter 18 Monaten, die nach CMV spezifischer Stimulation keine IFN- γ -Produktion zeigten, waren die SEB reaktiven T-Zellen in der Lage TNF- α und IL-2 zu bilden, während die SEB induzierte IFN- γ -Produktion in dieser Gruppe wesentlich geringer war. Demgegenüber wiesen die Kinder derselben Altersgruppe mit nachweisbarer zellulärer Immunität gegen CMV signifikant höhere T-Zell-Frequenzen SEB reaktiver Zellen auf. Diese Unterschiede galten nicht nur für IFN- γ , sondern auch für TNF- α , IL-2 und IL-17, während keine Frequenzdifferenz für IL-4 produzierende Zellen gefunden wurde (Abbildung 9). Bei Kindern über 18 Monaten und Erwachsenen (Mütter) wurde kein Unterschied in der Frequenz SEB reaktiver T-Zellen zwischen CMV positiven und negativen Probanden gefunden. Diese Beobachtungen lassen schließen, dass eine CMV-Infektion in früher Kindheit zur Induktion von TH1- und TH17-Zellen beiträgt, die sich nach polyklonaler Stimulation detektieren lässt.

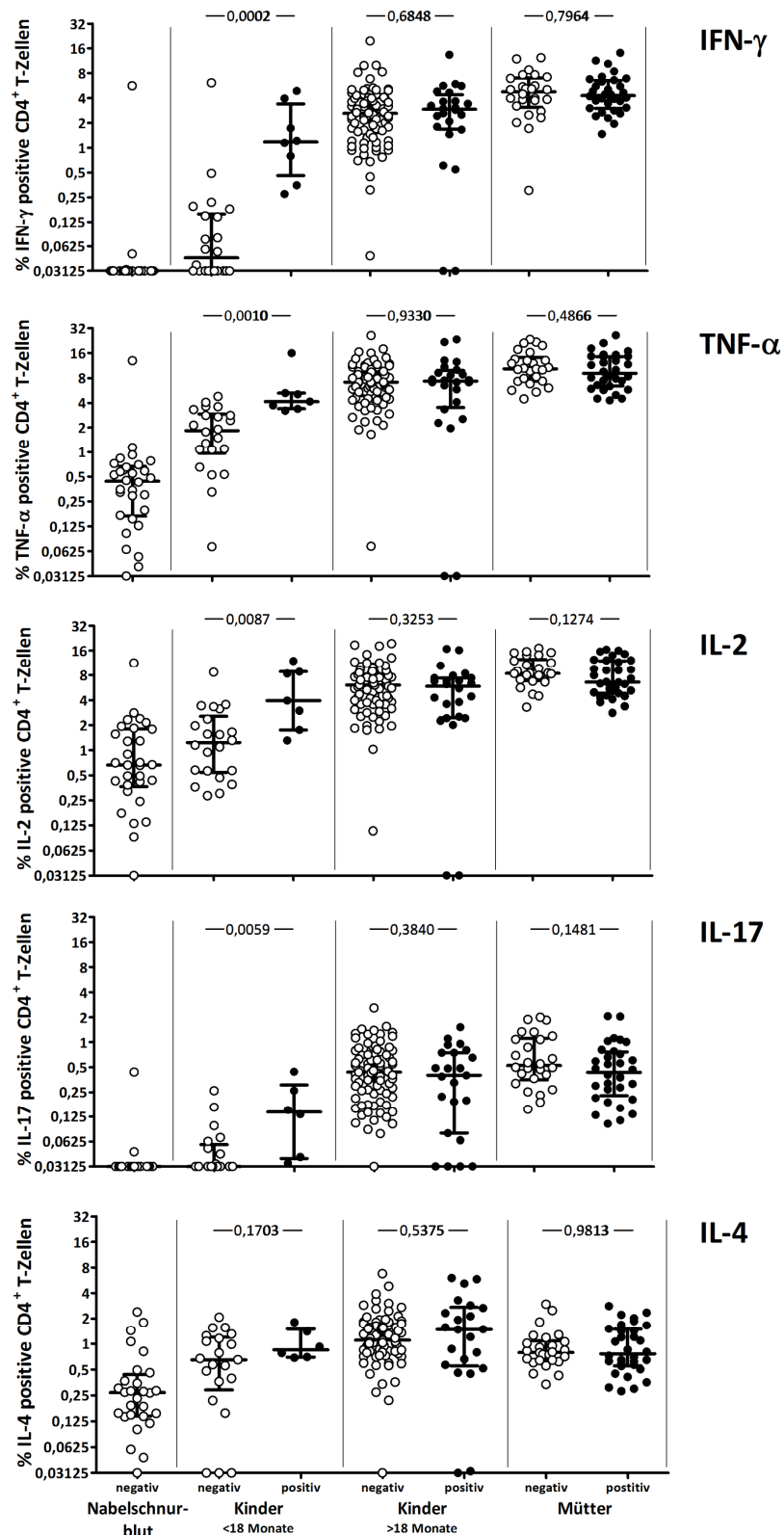


Abbildung 9. Neugeborene mit CMV spezifischer CD4⁺ T-Zell Immunität zeigen stärkere polyklonale Reaktionen der TH1- und TH17-Zellen. Nach Stimulation mit SEB wurde der prozentuale Anteil von IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17 und IL-4 positiven CD4⁺ T-Zellen bei Probanden bestimmt, die eine Reaktion nach einer CMV spezifischen Stimulation zeigen (schwarze Punkte), beziehungsweise diese nicht zeigen (Kreise). Jedes Symbol stellt einen Probanden, die Linien die medianen Frequenzen dar. Unter den acht Kindern unter 18 Monaten mit nachweisbarer CMV spezifischer Immunität, standen nur sieben von acht Proben für die Analyse von TNF- α und IL-2 und nur sechs von acht Proben für die Analyse von IL-17 und IL-4 zur Verfügung. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (RITTER et al., 2013).

4.7 „Proof of principle“: Die CMV spezifische CD4⁺ T-Zell-Immunität erlaubt auch die Identifizierung des CMV-Status bei Erwachsenen mit passiver Immunität

Im Falle der zuvor untersuchten seropositiven Kinder unter 18 Monaten ohne Nachweis CMV spezifischer T-Zellen ist von einer passiven mütterlichen Antikörperimmunität auszugehen. Im Folgenden wurde ein 40-jähriger ursprünglich CMV seronegativer Hämodialysepatient vor und nach ABO inkompatibler Transplantation einer Niere seiner CMV seropositiven Mutter untersucht. Bei diesem Patienten wurde ein passiver Antikörperstatus temporär durch therapeutische Gabe von humanen Immunglobulinen induziert. Diese Situation war geeignet, um die Bedeutung der CMV spezifischen T-Zellen zur Bestimmung des exakten CMV-Status bei Erwachsenen mit passiver Immunität im Setting der Transplantation zu evaluieren. Darüber hinaus erlitt der Patient im weiteren Verlauf eine Transplantat assoziierte CMV-Primärinfektion, wodurch ein tatsächlich positiver CMV-Status erreicht wurde.

Vor Transplantation erhielt der Organempfänger Rituximab (einmalige Gabe 28 Tage vor Transplantation) und eine einmalige Gabe von 0,35g/kg Körpergewicht humanes Immunglobulin (30g/86kg, Privigen, Behring, Marburg, Deutschland, einen Tag vor Transplantation). Für drei Monate wurde eine Valganciclovirprophylaxe durchgeführt. Das immunsuppressive Therapieregime bestand aus Basiliximab, Tacrolimus, Mycopenolat mofetile und Steroiden.

Die Analyse der CMV spezifischen zellulären und humoralen Immunität sowie der CMV-Viruslast vor und im Verlauf nach Gabe von humanen Immunglobulinen und nach Transplantat assoziierter CMV-Primärinfektion ist in Abbildung 10 und Abbildung 11 zusammengefasst. Originalmessungen charakteristischer Zeitpunkte im Verlauf vor und nach Gabe von humanen Immunglobulinen und Primärinfektion sind mittels Dotplots dargestellt (Abbildung 10).

Ursprünglich wies der Patient sowohl in der Serologie als auch im T-Zell-Test ein negatives Ergebnis auf (Abbildung 10, #1). Einen Tag nach Gabe von humanen Immunglobulinen war eine temporäre Konversion im Antikörperstatus messbar (Abbildung 10, #2, passive Immunität), während CMV spezifische T-Zellen erwartungsgemäß unter der Nachweisgrenze blieben. Dass in dieser Zeit grundsätzlich eine spezifische T-Zellreaktion nachweisbar ist, zeigen die Reaktivitäten der T-Zellen nach SEB-Stimulation.

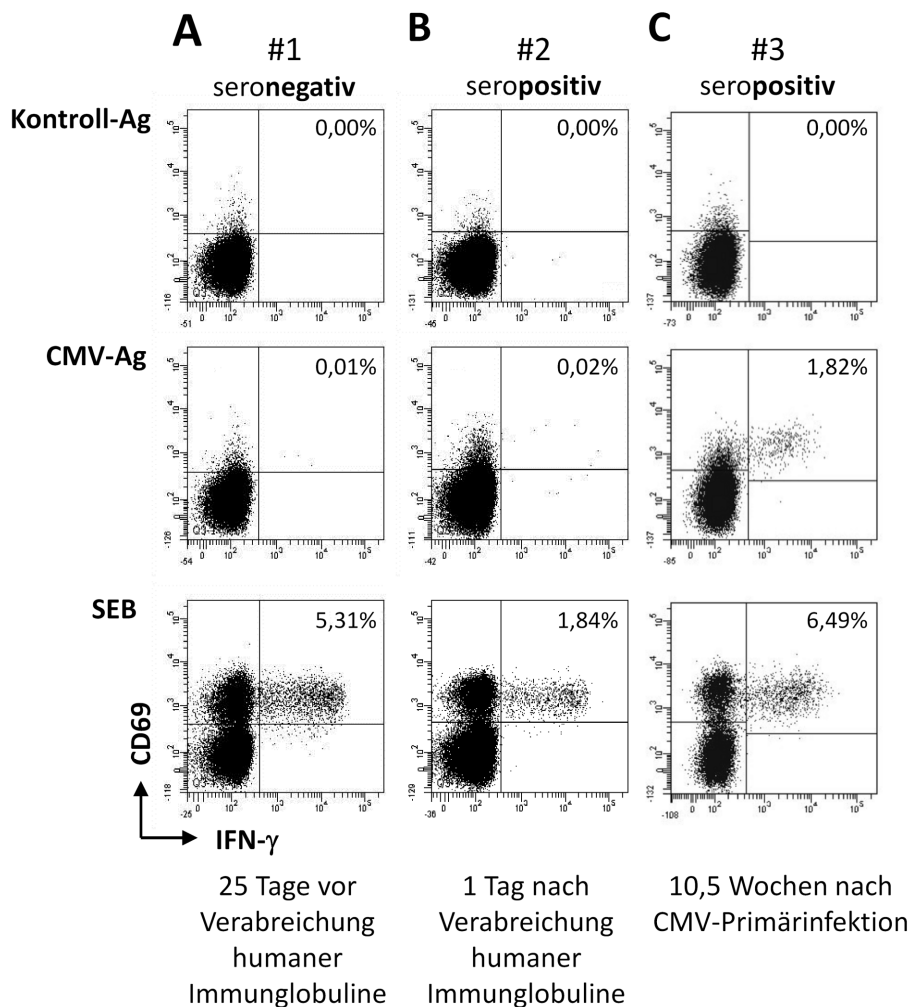


Abbildung 10. Durch die Analyse CMV spezifischer CD4⁺ T-Zellen kann der tatsächliche CMV-Infektionsstatus ermittelt werden. Originalmessungen CMV spezifischer T-Zellen eines 40-jährigen zunächst CMV seronegativen männlichen Patienten (A) 25 Tage vor und (B) einen Tag nach Infusion von humanen Immunglobulinen (Privigen, Behring 0,35g/kg), sowie (C) 10,5 Wochen nach CMV-Primärinfektion durch Nierentransplantation. Die 59-jährige Organspenderin wurde vor der Transplantation CMV seropositiv getestet. Die Prozentangaben in den Dotplots beziffern die Frequenzen der CD69/IFN- γ doppelt positiven CD4⁺ T-Zellen. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHMIDT et al., 2012).

Im weiteren Verlauf erlitt der Patient einen CMV-Primärinfekt (3,25 Monate nach Ende einer dreimonatigen Valganciclovir-Prophylaxe), der mit einem Anstieg in der Viruslast auf bis zu 4000 Kopien/ml assoziiert war (Abbildung 11). Als diagnostisches Zeichen eines tatsächlich positiven CMV-Status entwickelte der Patient sowohl eine CMV spezifische zelluläre und – leicht verzögert – eine humorale Immunität, die im weiteren Verlauf stabil erhalten blieb (Abbildung 10, #3 und Abbildung 11).

Zusammenfassend bestätigte die fehlende zelluläre Immunität im Sinne eines „proof-of-principle“ das bekanntermaßen durch passiven Transfer falsch positive Ergebnis der serologischen Testung.

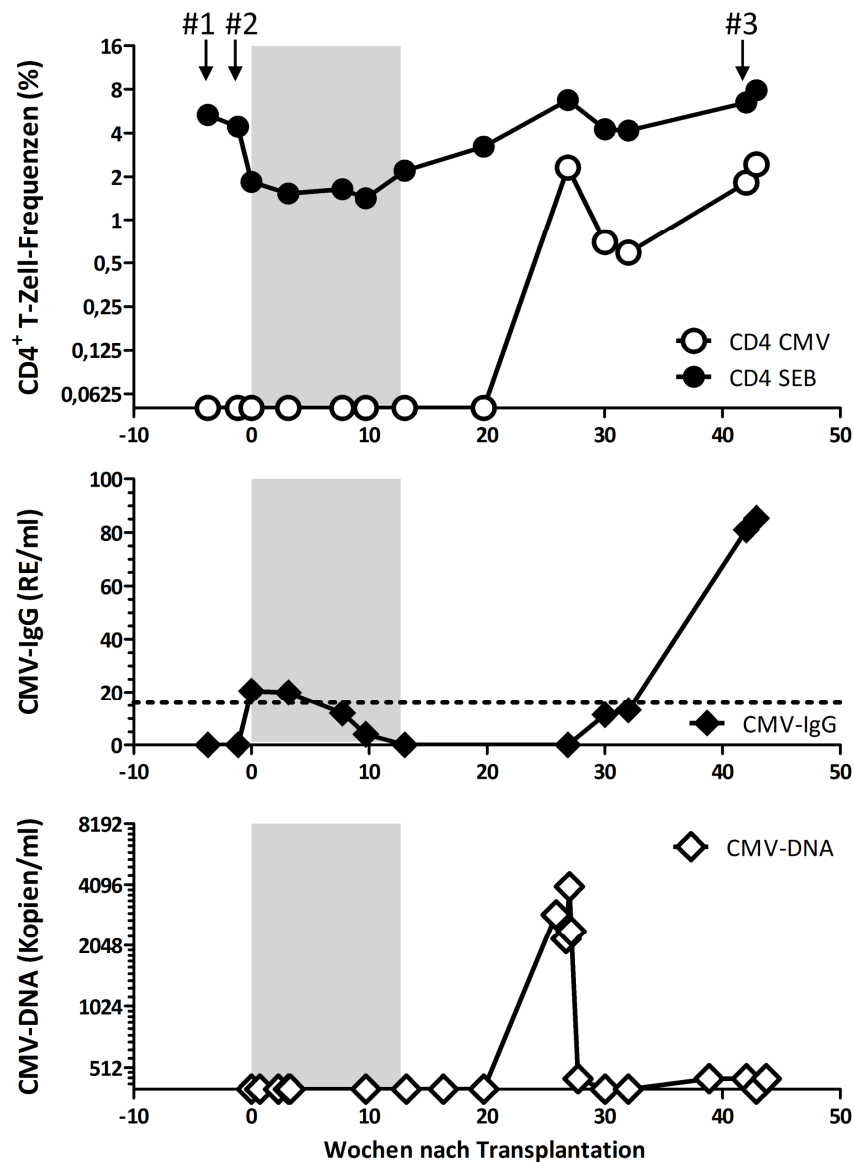


Abbildung 11. Vergleichende Analyse von CMV spezifischer CD4⁺ T-Zell-Immunität mit der CMV-Serologie bei einem Nierentransplantierten mit temporär passiver Immunität und anschließend CMV-Primärinfekt. Gegenübergestellt ist der zeitliche Verlauf der CMV spezifischen zellulären und humoralen Immunität sowie die CMV spezifische Viruslast. Nach CMV-Primärinfektion wurden CMV spezifische CD4⁺ T-Zellen vor CMV spezifischen Antikörpern der Klasse G nachgewiesen. Die grauen Bereiche stellen den Zeitraum der antiviralen Prophylaxe mit Valganciclovir dar. Die mit #1-3 beschrifteten Zeitpunkte beziehen sich auf die Darstellung der CMV spezifischen CD4⁺ T-Zell-Immunität in Abbildung 10. Die relativen CMV spezifischen Antikörper-Titer wurden gemäß der Herstellerangaben in RE/ml angegeben; die gestrichelte Linie zeigt die Obergrenze für negative Ergebnisse an (16 RE/ml). Der klinisch relevante Grenzwert für einen CMV-DNA-Nachweis sind 400 Kopien/ml. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHMIDT et al., 2012).

5. Diskussion

5.1 Die CMV spezifische CD4⁺ T-Zell-Analyse zur Demaskierung einer passiven Immunität

Kinder tragen nach Organtransplantation unter Immunsuppression das gleiche Risiko wie erwachsene Transplantatempfänger eine CMV-Primärinfektion oder eine CMV-Reaktivierung einer vorbestehenden Infektion zu entwickeln. Das Risiko wird dabei hauptsächlich vom CMV-Infektionsstatus des Spenders und des Empfängers bestimmt (KOTTON et al., 2013). Vor einer geplanten Transplantation kommt demnach der Bestimmung des CMV-Infektionsstatus von Transplantat-Spender und -Empfänger eine große Bedeutung für die Wahl der therapeutischen Strategie zu. Dazu wird eine CMV spezifische serologische Testung der an der Transplantation beteiligten Patienten durchgeführt. Die serologische Analyse ist eine in der klinischen Praxis etablierte diagnostische Untersuchung, die allerdings bei jungen Kindern aufgrund möglich vorhandener passiver mütterlicher Antikörpertiter zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde daher evaluiert, inwieweit die Bestimmung der CMV spezifischen zellulären Immunität eine genauere diagnostische Methode zur Bestimmung des CMV-Infektionsstatus bei Kindern mit passiver Immunität darstellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich CMV spezifische CD4⁺ T-Zellen grundsätzlich bei Kindern nachweisen lassen und dass die Präsenz CMV spezifischer CD4⁺ T-Zellen bei Kindern über 18 Monaten sehr gut mit dem CMV-Serostatus übereinstimmt. Bei seropositiven Kindern unter 18 Monaten, deren Antikörpertiter potentiell auf eine passive mütterliche Immunität zurückzuführen sein könnte, zeigte der T-Zell-Test, dass bereits mehr als 60% dieser Kinder nachweisbare CMV spezifische T-Zellen besaßen. Dies lässt schließen, dass bereits die Mehrheit der seropositiven Kinder tatsächlich eine eigene spezifische Immunität aufgebaut hat, sodass das Ausmaß der passiven Immunität in dieser Altersgruppe bislang vermutlich überschätzt wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen zusätzlich darauf hin, dass eine passive Immunität vermutlich lediglich bis zu einem Alter von 12, anstatt 18 Monaten angenommen werden sollte. Innerhalb der 13 seropositiven Kinder unter 18 Monate waren bereits vier Kinder über 12 Monate alt und bei allen vier Kindern war bereits eine CMV spezifische zelluläre Immunität nachweisbar. Demgegenüber zeigten lediglich vier der neun seropositiven Kinder unter 12 Monaten eine nachweisbare CMV spezifische T-Zellantwort, während die Abwesenheit spezifischer T-Zellen bei fünf von neun Kindern auf eine passive mütterliche Immunität schließen lässt. Eine

ähnliche Dynamik der Abnahme mütterlicher Antikörpertiter innerhalb von neun bis elf Monaten wurde bereits zuvor bei der humoralen Immunität gegen Masernviren beschrieben (LEURIDAN, VAN DAMME, 2007). Vor diesem Hintergrund erscheint die aktualisierte Version der internationalen CMV-Konsensus-Empfehlungen sinnvoll, auch im Setting der Transplantation lediglich bei seropositiven Kindern unter 12 Monaten eine passive Antikörperimmunität anzunehmen (KOTTON et al., 2013), während die Erstversion der Guidelines aus dem Jahre 2010 empfahl, bis zu einem Alter von 18 Monaten von der Möglichkeit passiver mütterlicher Antikörper auszugehen (KOTTON et al., 2010). In den neuesten internationalen Konsensus-Empfehlungen sowie in Empfehlungen deutscher Fachgesellschaften werden die Ergebnisse dieser Arbeit bereits als vielversprechende Möglichkeit beschrieben, bei Kindern unter 12 Monaten den tatsächlichen CMV-Infektionsstatus über den Nachweis CMV spezifischer T-Zellen zu ermitteln (KLIEM et al., 2015; KOTTON et al., 2013).

Neben der Anwendung bei Kindern könnte die Analyse CMV spezifischer CD4⁺ T-Zellen zukünftig generell in allen klinischen Situationen Anwendung finden, in denen serologische Untersuchungsergebnisse keine zuverlässige Einschätzung des CMV-Infektionsstatus erlauben. Wenngleich die serologische Bestimmung des CMV-Status in den meisten klinischen Situationen bei Erwachsenen eine zuverlässige diagnostische Untersuchung darstellt, um den tatsächlichen CMV-Infektionsstatus zu ermitteln, zeigt das Beispiel eines CMV seronegativen nierentransplantierten Patienten, bei dem nach einer Antikörper-Infusion eine passiv erworbene positive CMV-Serologie vorlag, dass der tatsächliche CMV-Infektionsstatus durch Analyse CMV spezifischer CD4⁺ T-Zellen auch bei Erwachsenen präziser ermittelt werden kann als durch die Serologie (SCHMIDT et al., 2012). Das Konzept zur genaueren Bestimmung des CMV-Infektionsstatus durch CMV spezifische T-Zellen bei Personen mit passiver Immunität ist in Abbildung 12 zusammengefasst, die einem Kommentar zur Publikation dieser Arbeit entnommen wurde (EMERY, 2013).

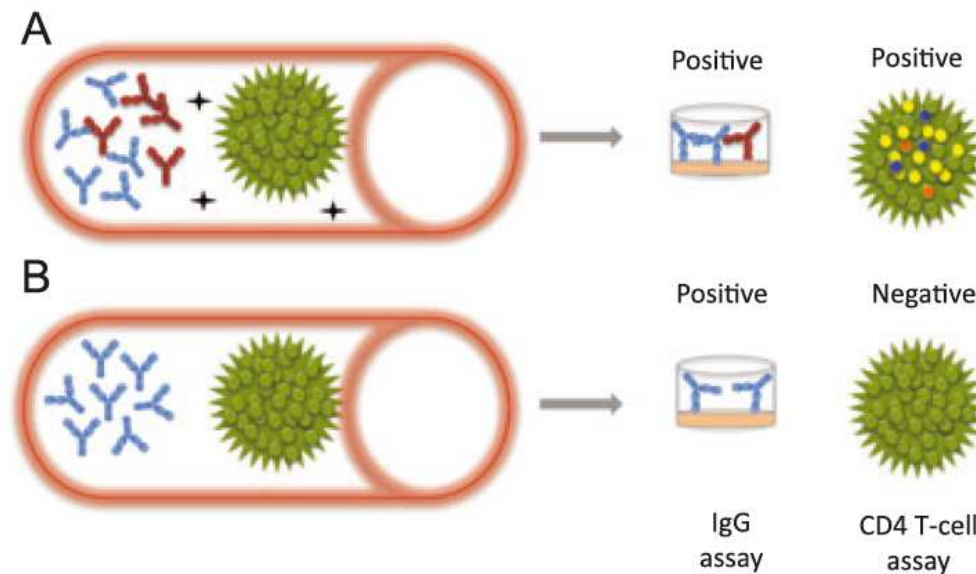


Abbildung 12. Konzept zur Bestimmung des CMV-Infektionsstatus durch CMV spezifische T-Zellen bei Personen mit passiver Immunität. Dargestellt ist ein Blutgefäß (braune Struktur) mit CMV spezifischen Immunglobulinen (IgG), die entweder mütterlicher (blau) oder kindlicher (rot) Herkunft sind. $CD4^+$ T-Zellen sind grün und Cytomegalieviren sind mit einem schwarzen Kreuz dargestellt. **(A)** Bei einem CMV infizierten Kind führt die Anwesenheit kindlicher und mütterlicher IgG zu einem positiven Ergebnis im Antikörper-IgG-Assay. Zudem kann die Präsenz CMV spezifischer T-Zellen durch die Induktion von Zytokinen nach Stimulation mit CMV-Antigenen in vitro nachgewiesen werden (IFN- γ , IL-2 und TNF- α , hier dargestellt als gelbe, blaue und rote Punkte). **(B)** Die Blutprobe eines Kindes, das mütterliche Antikörper (blau), aber keine CMV spezifischen T-Zellen enthält, wie es bei nicht infizierten Kindern zu erwarten ist, führt zu einem positivem Ergebnis im IgG-Assay und einem negativen Ergebnis im T-Zell-Test. Das Konzept lässt sich auch auf die Situation einer Person mit passiv transfundierter Antikörperimmunität übertragen, bei der passiv transfundierte Antikörper blau und autolog gebildete Antikörper rot dargestellt sind. Die Abbildung wurde mit Genehmigung des Verlages (Wiley) einem Kommentar von Prof. Vincent Emery zur Publikation dieser Arbeit entnommen (EMERY, 2013).

5.2 Die Bedeutung der exakteren Bestimmung des CMV-Infektionsstatus für die Risikoabschätzung einer CMV-Infektion nach Transplantation

Generell bestimmt der über die Serologie ermittelte CMV-Infektionsstatus bei Organspender und -empfänger das Risiko einer CMV-Reaktivierung oder -Primärinfektion nach Transplantation und hat folglich unmittelbare Auswirkungen auf die Wahl der CMV-Behandlungsstrategie (Tabelle 12). Wenn sowohl Organempfänger als auch -spender CMV negativ sind (Fall 1), besteht kein Risiko für eine CMV-Infektion, sodass in dieser Konstellation keine CMV präventive Strategie empfohlen wird (KOTTON et al., 2010). Wenn hingegen ein CMV negativer Organempfänger ein Organ eines CMV positiven Spenders erhält, trägt der Empfänger ein hohes Risiko eine CMV-Infektion zu entwickeln (Fall 2). Daher wird in diesem Fall eine drei bis sechs monatige Valganciclovir-Prophylaxe empfohlen (KOTTON et al., 2010). Ein moderates Risiko für die Entwicklung einer CMV-Infektion tragen CMV positive Organempfänger, die ein Organ eines CMV positiven oder negativen Spenders

erhalten (Fall 3 und 4). Bei moderatem Risiko sollte entweder eine drei bis sechs monatige Valganciclovir-Prophylaxe oder eine präemptive Therapie durchgeführt werden (KOTTON et al., 2010).

Tabelle 12: Präventive Strategien auf Basis des CMV-Infektionsstatus bei Organempfänger und Organspender

CMV-Status Empfänger	negativ		positiv	
CMV-Status Spender	negativ	positiv	negativ	positiv
Risiko für CMV-Komplikationen	kein Risiko	hohes Risiko	moderates Risiko	moderates Risiko
präventive Strategien (Medikamentenregime ^a)	keine Therapie	Prophylaxe (3-6 Monate Valganciclovir)	Prophylaxe (3(-6) Monate Valganciclovir) oder präemptive Therapie (Valganciclovir oder i.v. Ganciclovir)	Prophylaxe (3(-6) Monate Valganciclovir) oder präemptive Therapie (Valganciclovir oder i.v. Ganciclovir)
Fall	1	2	3	4

^aaufgeführt sind die gebräuchlichsten Medikamentenregime (für weitere Optionen siehe (KOTTON et al., 2010)). Tabelle reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHMIDT et al., 2012).

Aktuell empfehlen Guidelines aufgrund der Unsicherheiten bei der Interpretation von serologischen Testergebnissen bei jungen Kindern, die potentiell Träger einer passiven mütterlichen humoralen Immunität sein könnten, im Rahmen von Transplantationen stets das höchste CMV-Infektionsrisiko für den Organempfänger anzunehmen (KOTTON et al., 2013). Das bedeutet, dass serologisch positiv getestete Organspender unter 18 Monaten als CMV positiv, serologisch positiv getestete Organempfänger unter 18 Monaten hingegen als CMV negativ eingestuft werden sollten. Falsch positive serologische Testergebnisse sind dabei nicht nur bei jungen Kindern, sondern auch bei Erwachsenen nach therapeutischer Gabe von Antikörperpräparaten möglich. Daher empfehlen Guidelines bei unsicheren serologischen Testergebnissen in jeder Altersgruppe von einem positiven CMV-Infektionsstatus bei Organspendern und von einem negativen CMV-Infektionsstaus bei Organempfängern auszugehen (KOTTON et al., 2010). Die Möglichkeit zur exakteren

Bestimmung des CMV-Infektionsstatus durch die Analyse CMV spezifischer CD4⁺ T-Zellen bei Kindern und Erwachsenen mit potentiell passiven Antikörpertitern ist daher von unmittelbarem praktischen Nutzen. Die CMV spezifische T-Zell-Analyse ermöglicht daher durch die exaktere Definition des CMV-Infektionsstatus eine zielgerichtete Wahl der Therapiestrategie, was zusätzlich zur Verminderung von Nebenwirkungen und Kosten einer antiviralen Therapie beiträgt.

Wenn ein falsch positiver, weil passiver Antikörperstatus mittels eines serologischen Assays nicht von einem tatsächlich positiven Antikörperstatus unterschieden werden kann, resultiert eine inadäquate Einschätzung des CMV-Infektionsrisikos und Zuordnung zu einer inadäquaten CMV-Präventions-Strategie. Wie sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine Verbesserung der Risikobewertung in solchen Empfänger-Spender-Konstellationen auswirken, bei denen ein unklarer CMV-Serostatus vorliegen könnte, ist im Folgenden anhand der in Tabelle 12 dargestellten Fälle illustriert. Wenn die Existenz von passiven Antikörpertitern nicht sicher ausgeschlossen werden kann, würde ein CMV negativer Organempfänger fälschlich als CMV positiv eingestuft werden und in die Risikogruppe mit moderat hohem Risiko eingeordnet werden (Tabelle 12, Fall 3 oder 4). Sollte in dieser Konstellation der Spender des Organs tatsächlich CMV negativ sein, würde der Patient eine prophylaktische CMV-Therapie erhalten. Unter Zuhilfenahme der zellulären Diagnostik würde jedoch erkannt werden, dass der Organempfänger CMV negativ ist, ein Organ eines CMV negativen Spenders bekommt und daher keine präventive CMV-Therapie benötigt. In Kombination mit einem tatsächlich CMV positiven Spender könnte der eigentlich CMV negative Organempfänger trotz seines sehr hohen Risikos für die Entwicklung einer CMV-Infektion unter Umständen nur eine präemptive CMV-Therapie erhalten. Ein solcher Fall könnte auch zu einer zunehmenden medikamentös induzierten viralen Resistenz führen (COUZI et al., 2012). Ein CMV negativer Organempfänger eines falsch klassifizierten CMV positiven Organspenders würde ebenfalls in die falsche Risikogruppe eingeordnet werden (Fall 2 statt 1). Die serologische Testung allein kann also sowohl zu einer Unterschätzung als auch zu einer Überschätzung des tatsächlichen CMV-Infektionsrisikos bei Empfängern und Spendern mit passiver Immunität führen.

Diese Unsicherheiten in der Bewertung der serologischen Testergebnisse bestehen nicht nur bei Kindern unter 18 Monaten, sondern auch wenn Organspender oder Organempfänger vor

Transplantation Transfusionen von Blutprodukten erhalten, beziehungsweise vor einer Transfusion keine serologischen Tests durchgeführt wurden, auf die bei weiteren Untersuchungen Bezug genommen werden kann und einen Hinweis auf den tatsächlichen CMV-Infektionsstatus geben. Eine Transfusion von Blutprodukten erfolgt zwar nicht im Rahmen jeder Transplantation, ist in diesem klinischen Bereich jedoch häufig. Im Rahmen von Transplantationen werden Blutprodukte am häufigsten bei Lebertransplantationen durchgeführt, gefolgt von Transplantationen des Herzens und der Lunge (TRIULZI, 2002). An der Pittsburgh University wurden bei Lebertransplantationen beispielsweise im Mittel 13 Units „fresh frozen plasma“ im Rahmen eines Primärlebertransplantationsverfahrens transfundiert (TRIULZI, 2002). Auch bei Organspendern ist der Prozentsatz von falsch positiven Antikörpertitern nach Transfusionen hoch. Falsch positive serologische Ergebnisse wurden in über 40% der Fälle gefunden, wenn nach Transfusion Serumproben zur Bestimmung des CMV-Serostatus entnommen wurden (PREIKSAITIS et al., 2002). Obwohl passive Antikörpertiter im Vergleich zu echten Antikörpertitern häufig niedriger sind, können geringere Titer auch bei tatsächlich CMV positiven Patienten vorliegen, die durch transfusionsbedingte Hämodilutionseffekte entstanden sind (PREIKSAITIS et al., 2002). Guidelines empfehlen grundsätzlich, dass Spender-Empfänger-Konstellationen mit unsicheren serologischen Ergebnissen stets der höchsten CMV-Risikogruppe zugeordnet werden sollten (KOTTON et al., 2010). Bei Patienten, die multiple Transfusionen erhalten haben, sind daher unsichere Ergebnisse in der serologischen Testung ein klinisch relevantes Problem.

5.3 Quantitative und qualitative Charakterisierung CMV spezifischer CD4⁺ T-Zellen

Studien zur Analyse CMV spezifischer T-Zellen wurden bisher vorwiegend bei immunkompetenten und immungeschwächten Erwachsenen durchgeführt (GILLESPIE et al., 2000; KHAN et al., 2002; POURGHEYSARI et al., 2007; SESTER et al., 2008a; SESTER et al., 2001; SESTER et al., 2005; SESTER et al., 2008b). Die CMV spezifische Immunantwort bei Kindern ist hingegen nur unzureichend untersucht (APPAY et al., 2002; KOMATSU et al., 2006; MILES et al., 2007; TU et al., 2004). Mit der vorliegenden Arbeit wurde dahingehend eine Lücke geschlossen.

Mediane Frequenzen CMV spezifischer CD4⁺ T-Zellen zeigen bei immungesunden Probanden einen altersabhängigen Anstieg um etwa 1-2% (PORTEVIN et al., 2015; POURGHEYSARI et al.,

2007; SESTER et al., 2001; TU et al., 2004). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sowohl die Frequenz als auch das Funktionsprofil CMV spezifischer T-Zellen bei jungen Kindern mit einem erst kürzlich zurückliegenden CMV-Primärinfekt vereinbar sind. CMV spezifische T-Zell-Frequenzen waren bei jüngeren Kindern am geringsten und stiegen mit zunehmendem Alter an. Ähnliches wurde auch bei 13 serologisch positiv getesteten Kindern im Alter von 1,5-4 Jahren beobachtet, bei denen der Prozentsatz CMV reaktiver CD4⁺ T-Zellen geringer war als bei Erwachsenen (TU et al., 2004). Hinsichtlich der Funktionalität waren bei jüngeren Kindern vorwiegend IFN- γ einfach positive T-Zellen zu beobachten, während ältere Kinder und Erwachsene eine Dominanz multifunktionaler T-Zellen zeigten. Interessanterweise hat die stattgehabte CMV-Infektion bei Kindern unter 18 Monaten auch einen direkten Einfluss auf die Gesamtmenge der Effektor-T-Zellen, denn diese Arbeit demonstriert, dass polyklonal stimulierbare Effektor-T-Zellen bei den Kindern am höchsten sind, bei denen auch eine eigene CMV spezifische Immunität vorliegt. Demgegenüber sind die entsprechenden Frequenzen polyklonal aktivierbarer T-Zellen bei Kindern ohne Nachweis einer eigenen CMV spezifischen Immunität geringer. Aus dieser Beobachtung könnte schließen, dass der Nachweis polyklonaler Effektor-T-Zellen in der frühen Kindheit als Spiegel erster natürlicher Auseinandersetzungen mit Pathogenen angesehen werden kann. Die CMV-Infektion scheint in dieser Hinsicht zu den ersten Infektionen zu zählen, die in nennenswertem Maße Effektor-T-Zellen induzieren. Unterschiede in der Frequenz polyklonaler Effektor-T-Zellen zwischen CMV negativen und positiven Probanden bestehen bei älteren Kindern und Erwachsenen nicht mehr. Bei ihnen ist anzunehmen, dass bereits Immunantworten gegen eine Vielzahl von Infektionen und Impfungen über die Zeit akkumulierten, sodass der Einfluss der CMV-Infektion auf die polyklonale T-Zell-Antwort an Dominanz verliert.

Bei Kindern unter 18 Monaten könnte das geringe Ausmaß an durchlebten Infektionen auch eine wichtige Auswirkung auf die Interpretation von diagnostischen T-Zell-Test-Verfahren haben. In den letzten Jahren wurden kommerzielle IFN- γ basierte in vitro Tests zur Detektion einer spezifischen zellulären Immunantwort gegen *Mycobacterium tuberculosis* entwickelt (MACK et al., 2009). Die Sekretion von IFN- γ nach Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen wird bei diesen Tests als Readout-Zytokin verwendet, das über einen ELISA oder einen ELISPOT (enzyme-linked immuno spot) zur Identifizierung einer spezifischen Immunantwort herangezogen wird (MACK et al., 2009). Wie bei der in dieser Arbeit angewandten durchflusszytometrischen Methode wird auch bei IFN- γ release assays (IGRAs)

eine polyklonale Stimulation mit Mitogen als Positivkontrolle der generellen T-Zell-Reaktivität durchgeführt. Ist bei dieser Mitogenstimulation keine Reaktion zu beobachten, so ist das Gesamtergebnis bei zusätzlicher Abwesenheit einer T-Zell-Antwort gegen mykobakterielle Antigene nicht schlüssig zu interpretieren. Erste Studien zur Anwendung dieser Tests bei Kindern liegen bereits vor (BASU ROY et al., 2012; DETJEN et al., 2007; KAMPMANN et al., 2009; LIGHTER et al., 2009; MARKOVA et al., 2011), bei denen insbesondere bei Kindern unter 5 Jahren ein hoher Anteil unschlüssiger Ergebnisse beschrieben wurde, die aufgrund der fehlenden Mitogenreaktion nicht eindeutig als negativ einzustufen waren (BERGAMINI et al., 2009; FERRARA et al., 2006; HAUSTEIN et al., 2009). Dies bedingt, dass der Wert der IGRAs bei jungen Kindern kontrovers diskutiert wird (DIEL, NIENHAUS, 2015; MACK et al., 2009). Da bei Neugeborenen eine Dominanz von TH2-Zellen beschrieben wurde (PRENDERGAST et al., 2012), lag die Frage nahe, ob eventuell neben IFN- γ andere Zytokine als Readout-System bei jungen Kindern geeigneter sind. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich jedoch, dass CMV spezifische T-Zellen zwar auch andere Zytokine wie TNF- α und IL-2 produzieren können, dass diese Zytokine jedoch nicht besser als IFN- γ geeignet sind, eine CMV spezifische T-Zell-Antwort zu detektieren. Eine CMV spezifische IL-4 oder IL-17 Produktion war nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen schließen, dass eine fehlende IFN- γ -Reaktivität nach Antigen spezifischer oder polyklonaler Stimulation bei Säuglingen nicht notwendigerweise ein Testversagen darstellt, sondern der natürliche Ausdruck einer noch kurzen Infektionsgeschichte ist. Wenn eine Immunschwäche als andere Ursache einer fehlenden Reaktivität ausgeschlossen werden kann, kann dies vermutlich eher auf einen tatsächlich negativen CMV-Infektionsstatus hinweisen. Mit zunehmendem Alter steigt dann die Reaktivität gegen Antigen spezifische oder polyklonale Stimuli, die das Ausmaß der Immunantwort gegen eine Vielzahl von Erregern, einschließlich CMV widerspiegelt.

5.4 Vergleich zwischen CMV spezifischer CD4⁺ T-Zell-Analyse und weiteren Assays zum Nachweis einer CMV-Infektion

Wie schon frühere Studien an Erwachsenen verdeutlichten (SESTER et al., 2003), zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Analyse CMV spezifischer T-Zellen mit der serologischen Analyse vergleichbar oder sogar noch aussagekräftiger in der Definition des tatsächlichen CMV-Infektionsstatus ist. Dies wird deutlich durch den Umstand, dass CMV spezifische CD4⁺ T-

Zellen bei zwei Erwachsenen detektierbar waren, obwohl CMV-IgG-Antikörpertiter bei diesen Probanden unterhalb der Nachweisgrenze waren. Dies lässt auf eine höhere Sensitivität des T-Zell-Verfahrens schließen, wenngleich die Sensitivität der serologischen Antikörperbestimmung durch den zusätzlichen Gebrauch weiterer ELISA-Testverfahren erhöht werden kann (LAGROU et al., 2009).

Bei Patienten mit potentiell passiven Antikörpertitern gibt es neben der serologischen Analyse und der T-Zell-Testung noch weitere Assays zum direkten Nachweis einer CMV-Infektion, die insbesondere bei Immungeschwächten oder Kleinkindern bei Verdacht auf CMV-Primärinfekt oder -Reaktivierung angewandt werden. Dazu gehören die Analyse der CMV-Viruslast im Urin oder Speichel, sowie die Bewertung der IgM- oder IgG-Avidität bei vorhandenen CMV spezifischen Immunglobulinen. Da insbesondere Kleinkinder langanhaltend Virus ausscheiden (ADLER, 1992; TU et al., 2004), ist ein positiver Virusnachweis ein sicheres Zeichen einer Infektion. Allerdings kann ein negatives Testergebnis eine Infektion nicht sicher ausschließen, da die Virusausscheidung nicht notwendigerweise kontinuierlich auftritt. Die Analyse CMV spezifischer Immunglobuline der Klasse IgM hat eine zu geringe Sensitivität, um zu einer Identifizierung von CMV infizierten Kindern beizutragen (MELISH, HANSHAW, 1973; SCHLESINGER et al., 2003; VILIBIC-CAVLEK et al., 2012). Die Testung der CMV-IgG-Avidität kann durchgeführt werden, um zwischen mütterlichen passiven IgG mit hoher Avidität und CMV spezifischen IgG mit geringer Avidität bei kürzlich erworbener CMV-Infektion bei Kindern zu unterscheiden (VILIBIC-CAVLEK et al., 2012). Bei jungen Kindern, die sich gerade mit CMV infiziert haben, kann es jedoch sein, dass mütterliche und kindliche CMV-IgG mit hoher und geringer Avidität gleichzeitig existieren. In dieser Situation scheint die Sensitivität des Aviditätstests nicht ausreichend hoch zu sein, um Antikörper mit geringer Avidität sicher zu identifizieren (VILIBIC-CAVLEK et al., 2012). In der vorliegenden Studie war es nicht möglich diese Art der Analysen zusätzlich zum T-Zell-Test und zur Serologie durchzuführen, da dann größere Blutvolumina gebraucht worden wären als im Rahmen dieser Studie zur Verfügung standen.

5.5 Limitationen

Eine Schwäche der vorliegenden Studie besteht darin, dass die Untersuchungen zur Charakterisierung der CMV spezifischen T-Zellen bislang lediglich bei immungesunden Kindern durchgeführt wurde und daher noch keine Erfahrungswerte zur Anwendung der T-

Zell-Analyse bei pädiatrischen Patienten im Setting einer Transplantation vorliegen. Um beurteilen zu können ob die CMV spezifische T-Zell-Analyse auch bei pädiatrischen Patienten mit Komorbiditäten anwendbar ist, müssen weitere Untersuchungen folgen. Dass CMV spezifische T-Zellen bei pädiatrischen Transplantatempfängern nachweisbar sind, hat bereits eine kleine Studie zeigen können (PATEL et al., 2012). Um den Nutzen und die Grenzen der CMV spezifischen T-Zell-Analyse neben der serologischen Testung bei sehr jungen Kindern im Setting einer Transplantation bewerten zu können, sind jedoch Studien mit größeren Fallzahlen nötig. Hierzu haben wir im Jahr 2014 eine Kollaboration mit der University of Alberta initiiert, die das Verfahren bei Kindern auf der Transplantationswarteliste evaluiert. Die Anwendung des Testverfahrens bei Erwachsenen wurde bislang lediglich in einem Fall als „proof of principle“ beschrieben, sodass der Einsatz des T-Zell-Tests in dieser Situation ebenfalls in größeren Studien evaluiert werden sollte.

Es muss weiterhin untersucht werden, ob die Anwendung des beschriebenen T-Zell-Tests bei kritisch kranken Transplantatempfängern oder Organspendern möglicherweise durch eine fortschreitende T-Zell-Anergie oder durch einen unspezifischen Zytokinsturm limitiert sein könnte. Hier geben positive Kontrollstimulationen die Möglichkeit zur Unterscheidung, ob eine generelle T-Zell-Anergie vorliegt oder ob es sich tatsächlich um ein echt negatives Testergebnis handelt. Eine kürzlich durchgeführte Studie unserer Arbeitsgruppe zum Vergleich serologischer und T zellulärer Verfahren bei Organspendern, bei der ich ebenfalls experimentell beteiligt war, zeigte in der Tat, dass Erreger spezifische T-Zellen auch nach Eintreten des Hirntodes nachgewiesen werden können, dass jedoch in erhöhtem Maße auch unschlüssige Ergebnisse auftraten (SCHMIDT et al., 2014).

5.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

T-Zell basierte Immunitätstests werden zunehmend beim Monitoring infektiöser Komplikationen nach Transplantationen verwendet (CROUGH, KHANNA, 2009; SESTER et al., 2008a). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die CMV spezifische CD4⁺ T-Zell-Analyse Potential einer neuartigen Anwendung zur Beurteilung des tatsächlichen Infektionsstatus bei Patienten mit potentiell passiver Immunität bietet, die sowohl bei Kindern mit mütterlicher Immunität als auch bei Erwachsenen nach passiver Gabe von Antikörperpräparaten evaluiert wurde.

Der T-Zell-Test, der in dieser Arbeit angewandt wurde, kann sehr gut in die klinische Praxis integriert werden. Innerhalb von einem Arbeitstag können CMV spezifische T-Zellen aus einem kleinen Volumen von weniger als einem Milliliter mit Hilfe eines Standard-Durchflusszytometriegeätes quantifiziert und funktionell charakterisiert werden. Folglich kann der Test bei prospektiven Studien angewendet werden und die Grundlage für ein antivirales Management bei Erwachsenen und Kindern mit potentiell passiver Immunität bilden. Wie schon bei Erwachsenen evaluiert (DIRKS et al., 2013; SESTER et al., 2008a; SESTER et al., 2001), kann der vorliegende Test ebenfalls longitudinal zur Messung der individuellen CMV spezifischen Immunität zur Vorhersage von Virus-Reaktivierungsereignissen nach Transplantation bei Kindern angewendet werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Adler SP (1992) Cytomegalovirus transmission and child day care. *Adv Pediatr Infect Dis* 7:109-122
2. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL (2002) Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8:379-385
3. Basu Roy R, Sotgiu G, Altet-Gomez N, Tsolia M, Ruga E, Velizarova S, Kampmann B (2012) Identifying predictors of interferon-gamma release assay results in pediatric latent tuberculosis: a protective role of bacillus Calmette-Guerin?: a pTB-NET collaborative study. *Am J Respir Crit Care Med* 186:378-384
4. Bedoya SK, Lam B, Lau K, Larkin J, 3rd (2013) Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Clin Dev Immunol* 2013:986789
5. Bergamini BM, Losi M, Vaienti F, D'Amico R, Meccugni B, Meacci M, De Giovanni D, Rumpianesi F, Fabbri LM, Balli F, Richeldi L (2009) Performance of commercial blood tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Pediatrics* 123:e419-424
6. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H (2008) *Pathologie*, 4 edn München, Jena, Urban und Fischer.
7. Buffone GJ, Frost A, Samo T, Demmler GJ, Cagle PT, Lawrence EC (1993) The diagnosis of CMV pneumonitis in lung and heart/lung transplant patients by PCR compared with traditional laboratory criteria. *Transplantation* 56:342-347
8. Caliendo AM, St George K, Kao SY, Allega J, Tan BH, LaFontaine R, Bui L, Rinaldo CR (2000) Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV antigenemia assay: clinical utility of the prototype AMPLICOR CMV MONITOR test in transplant recipients. *J Clin Microbiol* 38:2122-2127
9. Caliendo AM, St George K, Allega J, Bullotta AC, Gilbane L, Rinaldo CR (2002) Distinguishing cytomegalovirus (CMV) infection and disease with CMV nucleic acid assays. *J Clin Microbiol* 40:1581-1586
10. Couzi L, Helou S, Bachelet T, Moreau K, Martin S, Morel D, Lafon ME, Boyer B, Alain S, Garrigue I, Merville P (2012) High incidence of anticytomegalovirus drug resistance among D+R- kidney transplant recipients receiving preemptive therapy. *Am J Transplant* 12:202-209
11. Crough T, Khanna R (2009) Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* 22:76-98, Table of Contents

12. Detjen AK, Keil T, Roll S, Hauer B, Mauch H, Wahn U, Magdorf K (2007) Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 45:322-328
13. Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schultze-Mosgau A, Schneider K-TM, Weiss JM (2007) *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2 edn Heidelberg, Springer.
14. Diel R, Nienhaus A (2015) [Current Issues Arising from Tuberculosis Screening with Interferon-Gamma-Release Assays (IGRAs)]. *Pneumologie* 69:271-275
15. Dirks J, Tas H, Schmidt T, Kirsch S, Gärtner BC, Sester U, Sester M (2013) PD-1 analysis on CD28(-) CD27(-) CD4 T cells allows stimulation-independent assessment of CMV viremic episodes in transplant recipients. *Am J Transplant* 13:3132-3141
16. Emery VC (2013) CMV infected or not CMV infected: that is the question. *Eur J Immunol* 43:886-888
17. Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M, Meccugni B, Dori IM, Andreani A, Bergamini BM, Mussini C, Rumpianesi F, Fabbri LM, Richeldi L (2006) Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet* 367:1328-1334
18. Fishman JA, Rubin RH (1998) Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 338:1741-1751
19. Gerna G, Baldanti F, Lilleri D, Parea M, Torsellini M, Castiglioni B, Vitulo P, Pellegrini C, Vigano M, Grossi P, Revello MG (2003) Human cytomegalovirus pp67 mRNAemia versus pp65 antigenemia for guiding preemptive therapy in heart and lung transplant recipients: a prospective, randomized, controlled, open-label trial. *Transplantation* 75:1012-1019
20. Gillespie GM, Wills MR, Appay V, O'Callaghan C, Murphy M, Smith N, Sissons P, Rowland-Jones S, Bell JI, Moss PA (2000) Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol* 74:8140-8150
21. Gortner L, Meyer S, Sitzmann FC (2012) *Pädiatrie*, 4 edn Stuttgart, Thieme.
22. Green M, Michaels MG, Katz BZ, Burroughs M, Gerber D, Shneider BL, Newell K, Rowe D, Reyes J (2006) CMV-IVIG for prevention of Epstein Barr virus disease and posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplant recipients. *Am J Transplant* 6:1906-1912
23. Groß U (2006) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 1 edn Stuttgart, New York, Thieme.
24. Haustein T, Ridout DA, Hartley JC, Thaker U, Shingadia D, Klein NJ, Novelli V, Dixon GL (2009) The likelihood of an indeterminate test result from a whole-blood interferon-

- gamma release assay for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children correlates with age and immune status. *Pediatr Infect Dis J* 28:669-673
25. Huygens A, Dauby N, Vermijlen D, Marchant A (2014) Immunity to cytomegalovirus in early life. *Front Immunol* 5:552
 26. Kampmann B, Whittaker E, Williams A, Walters S, Gordon A, Martinez-Alier N, Williams B, Crook AM, Hutton AM, Anderson ST (2009) Interferon-gamma release assays do not identify more children with active tuberculosis than the tuberculin skin test. *Eur Respir J* 33:1374-1382
 27. Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, Nayak L, Moss PA (2002) Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol* 169:1984-1992
 28. Kliem V, Sester M, Nitschke M, Tönshoff B, Budde K, Hauser IA, Schmitt M, Höcker B, Witzke O (2015) Cytomegalovirus after renal transplantation - diagnosis, prevention and treatment. *Dtsch Med Wochenschr* 140:612-615
 29. Komatsu H, Inui A, Sogo T, Fujisawa T, Nagasaka H, Nonoyama S, Sierro S, Northfield J, Lucas M, Vargas A, Klenerman P (2006) Large scale analysis of pediatric antiviral CD8+ T cell populations reveals sustained, functional and mature responses. *Immun Ageing* 3:11
 30. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Snyderman DR, Allen U, Humar A, Transplantation Society International CMVCG (2010) International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 89:779-795
 31. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A, Transplantation Society International CMVCG (2013) Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 96:333-360
 32. Lagrou K, Bodeus M, Van Ranst M, Goubau P (2009) Evaluation of the new architect cytomegalovirus immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgG avidity assays. *J Clin Microbiol* 47:1695-1699
 33. Landis JR, Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33:159-174
 34. Lazzarotto T, Spezzacatena P, Pradelli P, Abate DA, Varani S, Landini MP (1997) Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 4:469-473
 35. Leuridan E, Van Damme P (2007) Passive transmission and persistence of naturally acquired or vaccine-induced maternal antibodies against measles in newborns. *Vaccine* 25:6296-6304

36. Lighter J, Rigaud M, Eduardo R, Peng CH, Pollack H (2009) Latent tuberculosis diagnosis in children by using the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test. *Pediatrics* 123:30-37
37. Mack U, Migliori GB, Sester M, Rieder HL, Ehlers S, Goletti D, Bossink A, Magdorf K, Holscher C, Kampmann B, Arend SM, Detjen A, Bothamley G, Zellweger JP, Milburn H, Diel R, Ravn P, Cobelens F, Cardona PJ, Kan B, Solovic I, Duarte R, Cirillo DM, Lange C, Tbnnet (2009) LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 33:956-973
38. Markova R, Drenska R, Minchev P, Todorova Y, Ciccozzi M, Amicosante M (2011) Association of age with the level of response in the QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay for children with active tuberculosis. *New Microbiol* 34:81-85
39. Melish ME, Hanshaw JB (1973) Congenital cytomegalovirus infection. Developmental progress of infants detected by routine screening. *Am J Dis Child* 126:190-194
40. Miles DJ, van der Sande M, Jeffries D, Kaye S, Ismaili J, Ojuola O, Sanneh M, Touray ES, Waight P, Rowland-Jones S, Whittle H, Marchant A (2007) Cytomegalovirus infection in Gambian infants leads to profound CD8 T-cell differentiation. *J Virol* 81:5766-5776
41. Modrow S, Dietrich F, Truyen U, Schätzl H (2010) *Molekulare Virologie*, 3 edn Heidelberg, Spektrum, akademischer Verlag.
42. Murphy K, Travers P, Walport M (2009) *Janeway Immunologie*, 7 edn Heidelberg, Spektrum, akademischer Verlag.
43. Patel M, Stefanidou M, Long CB, Fazzari MJ, Tesfa L, Del Rio M, Lamour J, Ricafort R, Madan RP, Herold BC (2012) Dynamics of cell-mediated immune responses to cytomegalovirus in pediatric transplantation recipients. *Pediatr Transplant* 16:18-28
44. Piiparinen H, Hockerstedt K, Gronhagen-Riska C, Lautenschlager I (2004) Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. *J Clin Virol* 30:258-266
45. Pillay D, Ali AA, Liu SF, Kops E, Sweny P, Griffiths PD (1993) The prognostic significance of positive CMV cultures during surveillance of renal transplant recipients. *Transplantation* 56:103-108
46. Portevin D, Moukambi F, Mpina M, Bauer A, Haraka F, Chachage M, Metzger P, Saathoff E, Clowes P, Ntinginya NE, Rachow A, Hoelscher M, Reither K, Daubenberger CA, Geldmacher C (2015) Maturation and Mip-1beta Production of Cytomegalovirus-Specific T Cell Responses in Tanzanian Children, Adolescents and Adults: Impact by HIV and Mycobacterium tuberculosis Co-Infections. *PLoS One* 10:e0126716
47. Pourgheysari B, Khan N, Best D, Bruton R, Nayak L, Moss PA (2007) The cytomegalovirus-specific CD4+ T-cell response expands with age and markedly alters the CD4+ T-cell repertoire. *J Virol* 81:7759-7765

48. Preiksaitis JK, Sandhu J, Strautman M (2002) The risk of transfusion-acquired CMV infection in seronegative solid-organ transplant recipients receiving non-WBC-reduced blood components not screened for CMV antibody (1984 to 1996): experience at a single Canadian center. *Transfusion* 42:396-402
49. Prendergast AJ, Klenerman P, Goulder PJ (2012) The impact of differential antiviral immunity in children and adults. *Nat Rev Immunol* 12:636-648
50. Ritter M, Schmidt T, Dirks J, Hennes P, Juhasz-Böss I, Solomayer EF, Gortner L, Gärtner B, Rohrer T, Sester U, Sester M (2013) Cytomegalovirus-specific T cells are detectable in early childhood and allow assignment of the infection status in children with passive maternal antibodies. *Eur J Immunol* 43:1099-1108
51. Schlesinger Y, Halle D, Eidelman AI, Reich D, Dayan D, Rudensky B, Raveh D, Branski D, Kaplan M, Shefer V, Miron D (2003) Urine polymerase chain reaction as a screening tool for the detection of congenital cytomegalovirus infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 88:F371-374
52. Schmidt T, Ritter M, Dirks J, Gärtner BC, Sester U, Sester M (2012) Cytomegalovirus-specific T-cell immunity to assign the infection status in individuals with passive immunity: a proof of principle. *J Clin Virol* 54:272-275
53. Schmidt T, Schub D, Wolf M, Dirks J, Ritter M, Leyking S, Singh M, Zawada AM, Blaes-Eise AB, Samuel U, Sester U, Sester M (2014) Comparative analysis of assays for detection of cell-mediated immunity toward cytomegalovirus and *M. tuberculosis* in samples from deceased organ donors. *Am J Transplant* 14:2159-2167
54. Schub D (2011) Charakterisierung der spezifischen Immunantwort gegen das Varizella-Zoster Virus, Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
55. Seed CR, Piscitelli LM, Maine GT, Lazzarotto T, Doherty K, Stricker R, Stricker R, Iriarte B, Patel C (2009) Validation of an automated immunoglobulin G-only cytomegalovirus (CMV) antibody screening assay and an assessment of the risk of transfusion transmitted CMV from seronegative blood. *Transfusion* 49:134-145
56. Sester M, Sester U, Gärtner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Meyerhans A, Köhler H (2001) Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* 71:1287-1294
57. Sester M, Gärtner BC, Sester U, Girndt MH, Mueller-Lantzsch N, Köhler H (2003) Is the cytomegalovirus serologic status always accurate? A comparative analysis of humoral and cellular immunity. *Transplantation* 76:1229-1231
58. Sester M, Gärtner BC, Sester U (2008a) Monitoring of CMV-specific T-cell levels after organ transplantation. *Laboratoriumsmedizin-Journal of Laboratory Medicine* 32:121-130
59. Sester U, Gärtner BC, Wilkens H, Schwaab B, Wössner R, Kindermann I, Girndt M, Meyerhans A, Mueller-Lantzsch N, Schäfers HJ, Sybrecht GW, Köhler H, Sester M

- (2005) Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant* 5:1483-1489
60. Sester U, Presser D, Dirks J, Gärtner BC, Köhler H, Sester M (2008b) PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus- specific T cells correlates with viremia and reversible functional energy. *Am J Transplant* 8:1486-1497
 61. Storch GA, Ettinger NA, Ockner D, Wick MR, Gaudreault-Keener M, Rossiter J, Trulock EP, Cooper JD (1993) Quantitative cultures of the cell fraction and supernatant of bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of cytomegalovirus pneumonitis in lung transplant recipients. *J Infect Dis* 168:1502-1506
 62. Triulzi DJ (2002) Specialized transfusion support for solid organ transplantation. *Curr Opin Hematol* 9:527-532
 63. Tu W, Chen S, Sharp M, Dekker C, Manganello AM, Tongson EC, Maecker HT, Holmes TH, Wang Z, Kemble G, Adler S, Arvin A, Lewis DB (2004) Persistent and selective deficiency of CD4+ T cell immunity to cytomegalovirus in immunocompetent young children. *J Immunol* 172:3260-3267
 64. Vilibic-Cavlek T, Ljubin-Sternak S, Vojnovic G, Sviben M, Mlinaric-Galinovic G (2012) The role of IgG avidity in diagnosis of cytomegalovirus infection in newborns and infants. *Coll Antropol* 36:297-300
 65. Zuniga LA, Jain R, Haines C, Cua DJ (2013) Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol Rev* 252:78-88

7. Publikationen

7.1 Manuskripte aus dieser Arbeit

1. Ritter, M.*, Schmidt, T.*, Dirks, J., Hennes, P., Juhasz-Böss, I., Solomayer, E.-F., Gortner, L., Gärtner, B., Rohrer, T., Sester, U., Sester, M. Cytomegalovirus-specific T cells are detectable in early childhood and allow assignment of the infection status in children with passive maternal antibodies. **Eur J Immunol.** 2013;43:1099-108. *geteilte Erstautorinnen; Impact Faktor: 5,103

Dieses Manuskript wurde durch folgenden Kommentar von Prof. Vincent Emery gewürdigt

Emery, VC. CMV infected or not CMV infected: that is the question. **Eur J Immunol.** 2013;43:886-8.

2. Schmidt, T., Ritter, M., Dirks, J., Gärtner, B., Sester, U., Sester, M. Cytomegalovirus-specific T-cell immunity to assign the infection status in individuals with passive immunity: a proof of principle. **J Clin Virol.** 2012;54:272-5. Impact Faktor: 4,023

7.2 Manuskript mit Koautorenschaft

3. Schmidt, T., Schub, D., Wolf, M., Dirks, J., Ritter, M., Leyking, S., Singh, M., Zawada, A. M., Blaes-Eise, A.-B., Samuel, U., Sester, U., Sester, M. Comparative analysis of assays for detection of cell-mediated immunity toward cytomegalovirus and M. tuberculosis in samples from deceased organ donors. **Am J Transplant.** 2014;14:2159-67. Impact Faktor: 6,190

7.3 Kongressvorträge

1. Ritter, M., Schmidt, T., Dirks, J., Hennes, P., Rohrer, T., Juhasz-Böss, I., Solomayer, E.-F., Gortner, L., Gärtner, B., Sester, U., Sester, M. Determination of CMV-specific T-cell immunity allows a refined definition of CMV infection status in infants with passive antibody titers.

The 21st Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie" (GfV, Society for Virology) together with the "Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V." (DVV), Freiburg 23.03.2011-26.03.2011 (Präsentation durch Marion Ritter)

2. Ritter, M., Schmidt, T., Dirks, J., Hennes, P., Rohrer, T., Juhasz-Böss, I., Solomayer, E.-F., Gortner, L., Gärtner, B., Sester, U., Sester, M. Refined assessment of the CMV infection status by determination of CMV-specific T-cell immunity in children with passive maternal antibody titers.

24th International Congress of The Transplantation Society, Berlin 15.06.2012-19.06.2012 (Präsentation durch Tina Schmidt)

7.4 Kongressposter

3. Ritter, M., Schmidt, T., Dirks, J., Hennes, P., Rohrer, T., Juhasz-Böss, I., Solomayer, E.-F., Gortner, L., Gärtner, B., Sester, U., Sester, M. Die Analyse CMV spezifischer T-Zellen zur genaueren Bestimmung des CMV-Infektstatus bei Probanden mit passiven Antikörpertitern.

55. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internisten Gesellschaft e.V., Neustadt an der Weinstraße 24.02.2011–26.02.2011 (Präsentation durch Marion Ritter)

4. Schmidt, T., Ritter, M., Dirks, J., Hennes, P., Rohrer, T., Juhasz-Böss, I., Solomayer, E.-F., Gortner, L., Gärtner, B., Sester, U., Sester, M. Refined definition of CMV infection status by determination of CMV-specific T-cell immunity in individuals with passive antibody titers.

American Transplant Congress, Philadelphia 30.04.2011-04.05.2011 (Präsentation durch Tina Schmidt)

5. Ritter, M., Schmidt, T., Dirks, J., Hennes, P., Rohrer, T., Juhasz-Böss, I., Solomayer, E.-F., Gortner, L., Gärtner, B., Sester, M., Sester, U. Determination of CMV-specific T-cell immunity allows a refined definition of CMV infection status in individuals with passive antibody titers.

3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin 10.09.2011-13.09.2011 (Präsentation durch Marion Ritter)

6. Ritter, M., Schmidt, T., Dirks, J., Hennes, P., Rohrer, T., Juhasz-Böss, I., Solomayer, E.-F., Gortner, L., Gärtner, B., Sester, U., Sester, M. Die Analyse CMV spezifischer T-Zellen zur genaueren Bestimmung des CMV-Infektstatus bei Probanden mit passiven Antikörpertitern.

Novartis Research Day Pädiatrie, Nürnberg 29.09.2011 (Präsentation durch Marion Ritter)

7. Ritter, M., Schmidt, T., Dirks, J., Hennes, P., Rohrer, T., Juhasz-Böss, I., Solomayer, E.-F., Gortner, L., Gärtner, B., Sester, U., Sester, M. Refined definition of CMV infection status by determination of CMV-specific T-cell immunity in individuals with passive antibody titers.

20. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Regensburg 6.10.2011-8.10.2011 (Präsentation durch Marion Ritter)

8. Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester und Herrn Prof. Dr. med. Urban Sester für die Überlassung dieses spannenden Themas. Ihr habt mir gezeigt, was es bedeutet wissenschaftlich zu arbeiten und wie viel Spaß das machen kann. Über eure zuverlässige Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit habe ich mich sehr gefreut.

Vielen Dank an Dr. rer. nat. Tina Schmidt für die außerordentlich gute Betreuung, die schnellen Rückmeldungen und die kurzen und langen Erklärungen zwischendurch.

Bei Dr. rer. nat. Jan Dirks bedanke ich mich für wertvolle Lösungen, Hilfen und Tipps bei wissenschaftlichen und technischen Fragestellungen und für den telefonischen FACS-Hintergrunddienst zu jeder Zeit.

Prof. Dr. med. Barbara Gärtner aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen.

Unseren medizinisch technischen Assistentinnen Candida Guckelmus und Katharina Schmitt danke ich für die gute Ausbildung in sauberer labormedizinischer Arbeitsweise und Dokumentation ebenso wie für ihre Hilfsbereitschaft beim experimentellen Teil dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso Dipl. Biol. David Schub, Dipl. Biol. Michaela Wolf, Dr. med. Julia Elsässer, Dr. med. Martin Janssen, Dr. med. Janine Mihm und Dr. med. Sarah Leyking für die hilfreichen Ratschläge im Rahmen der Doktorarbeit und des Studiums.

Folgenden Personen der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes danke ich für die große Unterstützung und Mithilfe bei der Gewinnung von Blutproben: Prof. Dr. med. Ludwig Gortner, Prof. Dr. med. Tilman Rohrer, Dr. med. Pia Hennes aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie, ebenso wie Prof. Dr. med. E.-F. Solomayer und Priv.-Doz. Dr. med. Ingolf Juhasz-Böss aus der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin.

Ich danke allen Kindern und Erwachsenen, die an dieser Studie teilgenommen haben.

Ein großes Dankeschön möchte ich nach Koblenz an meine Familie richten, deren Unterstützung und Rückhalt mir die Promotion ermöglicht haben.